

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Studijní program: Postgraduální doktorské studium v biomedicině

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Mgr. Jana Kloučková

**Molekulární mechanizmy vzniku metabolického syndromu se zaměřením na nové
hormony produkované tukovou, jaterní a svalovou tkání**

**Molecular mechanisms of metabolic syndrome with focus on new hormones pro-
duced by adipose tissue, liver and skeletal muscle**

Dizertační práce

Školitel: Prof. MUDr. Martin Haluzík, DrSc.

Praha 2017

Poděkování:

Především bych chtěla poděkovat svému školiteli prof. MUDr. Martinu Haluzíkovi, DrSc. za to, že mi umožnil podílet se na zajímavých projektech, za pomoc během celého studia a za podněty při vypracování doktorské dizertační práce. Mé díky patří také všem kolegům, se kterými jsem během svého studia spolupracovala – především kolegyním z Laboratoře endokrinologie a metabolismu ÚLBD 1. LF UK a VFN Praha. Bez spolupráce s nimi by má dizertační práce nikdy nemohla vzniknout. Jmenovitě bych chtěla poděkovat Mgr. Anně Cinkajzlové a MUDr. Miloši Mrázovi, PhD. za pomoc při sepsání této práce.

Obsah

Seznam použitých zkratek.....	5
Abstrakt.....	8
Abstract.....	9
1. Úvod.....	10
2. Metabolický syndrom.....	11
2.1. Obezita.....	12
2.2. Inzulínová rezistence.....	15
2.2.1. Vznik inzulínové rezistence.....	16
2.2.2. Vliv inzulínové rezistence na organismus.....	17
3. Tuková tkáň.....	19
3.1. Zánět tukové tkáně.....	20
3.1.1. Vznik zánětu v tukové tkáni.....	21
3.2. Endokrinní funkce tukové tkáně.....	23
3.2.1. Clusterin.....	23
3.2.2. Netrin-1.....	26
3.2.3. Glypican-4.....	27
3.2.4. Chemerin.....	28
3.2.5. Leptin.....	30
3.2.6. Prozánětlivé faktory produkované tukovou tkání.....	31
3.2.7. Faktory produkované tukovou tkání podílející se na adaptaci na oxidační stres a přežívání buněk.....	36
4. Hypoxie.....	39
4.1. Geny ovlivněné hypoxií.....	40
5. Hypotermie.....	42
6. Hypotéza a cíle práce.....	44
7. Metodika studie.....	45
7.1. Soubory vyšetřovaných osob, protokoly studií a odběr vzorků.....	45
7.1.1. Studie 1 – Vliv hluboké hypotermie na zánětlivou reakci v tukové tkáni: studie u pacientů podstupujících elektivní kardiochirurgickou operaci.....	45
7.1.2. Studie 2 – Clusterin u pacientů s obezitou a diabetes mellitus 2. typu: vliv krátkodobé hyperinzulinémie, nízkokalorické diety a bariatrické operace.....	47
7.1.2.1 Nízkokalorická dieta.....	48
7.1.2.2 Sleeve gastrektomie.....	49
7.1.2.3 Hyperinzulinemický euglykemický clamp.....	49
7.2. Stanovení biochemických a hormonálních parametrů z krevních vzorků.....	50
7.3. Izolace adipocytů z tukové tkáně.....	51

7.4.	Izolace RNA a stanovení mRNA exprese	51
7.5.	Stanovení množství proteinů pomocí proteinových arrayí	52
7.6.	Statistická analýza dat	53
8.	Výsledky	54
8.1.	Vliv hluboké hypotermie na zánět, tkáňovou hypoxii a endokrinní funkci tukové tkáně během kardiochirurgické operace	54
8.1.1.	Bazální charakteristiky pacientů zařazených do studie	54
8.1.2.	Sérové koncentrace vybraných faktorů u pacientů podstupujících operaci s navozením hluboké hypotermie.....	54
8.1.3.	mRNA exprese u pacientů podstupujících operaci s nebo bez hluboké hypotermie.	56
8.2.	Plazmatická koncentrace a mRNA exprese clusterinu v podkožní tukové tkáni u pacientů s obezitou a diabetes mellitus 2. typu: vliv krátkodobé hyperinzulinémie, nízkokalorické diety a bariatrické operace	60
8.2.1.	Nízkokalorická dieta.....	60
8.2.2.	Sleeve gastrektomie	64
8.2.3.	Hyperinzulinemický euglykemický clamp	66
8.2.4.	Vztah clusterinu a dalších zkoumaných parametrů	68
9.	Diskuze	71
10.	Závěr.....	82
11.	Literatura	85
12.	Přílohy	112
12.1.	Seznam publikovaných článků a abstrakt.....	112
12.1.1.	Publikace in extenso, které jsou podkladem dizertace.....	112
12.1.2.	Publikace in extenso bez vztahu k tématu dizertace	112
12.2.	Prohlášení o samostatném zpracování dizertační práce	116
12.3.	Identifikační záznam.....	116
12.4.	Plné verze publikovaných článků, které jsou podkladem dizertační práce	117

Seznam použitých zkratek

Akt	proteinkináza B (<i>thymomas of AKR mice</i>)
ApoJ	apolipoprotein J
B2M	beta-2-mikroglobulin
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-xL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BMI	index tělesné hmotnosti (<i>body mass index</i>)
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CCL	CC chemokin (<i>CC-motif ligand</i>)
CCR	CC chemokinový receptor (chemokin (CC motif) receptor)
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CLI	<i>complement lysis inhibitor</i>
CPB	kardiopulmonární bypass
CRP	C-reaktivní protein
CT	<i>threshold cycle</i>
CXCR	CXC chemokinový receptor
DCC	<i>deleted in colorectal cancer</i>
DM2	diabetes mellitus 2. typu
EAT	epikardiální tuková tkáň
ER	endoplazmatické retikulum
ERK	<i>extracellular signal regulated kinase</i>
FoxO	<i>forkhead transcriptional factor</i>
GLP-1	glukagonu podobný peptid 1
GLUT	glukózový transportér
Gpc4	glypican 4
GPI	glykofosfatidylinositol
GPX1	glutathion peroxidáza 1
HDL	lipoprotein s vysokou hustotou (<i>high density lipoprotein</i>)
HEC	euglykemický hyperinzulinemický clamp
HIF	hypoxií-indukovaný faktor
HIF-1 α	α podjednotka hypoxií-indukovaného faktoru 1
HOMA-IR	<i>Homeostasis model assessment - insulin resistance index</i>
ChemR23	Chemerinový receptor 23

IDF	Mezinárodní diabetologická federace (<i>International Diabetes Federation</i>)
IF	impakt faktor
IFN- γ	interferon- γ
IGF-1R	receptor pro inzulínu podobný růstový faktor 1 (<i>insulin-like growth factor 1 receptor</i>)
IGT	porušená glukózová tolerance (<i>impaired glucose tolerance</i>)
IKK β	I κ B kináza
IL	interleukin
IR	inzulínová rezistence
IRS	substrát inzulínového receptoru (<i>insulin receptor substrate</i>)
Jak	Janusova kináza
JNK	c-Jun-N-terminální kináza
LDL	lipoprotein s nízkou hustotou (<i>low density lipoprotein</i>)
LPS	lipopolysacharid
LRP2	LDL receptoru příbuzný protein 2 (<i>low-density lipoprotein receptor-related protein-2</i>)
LSG	laparoskopická tubulizace žaludku (<i>laparoscopic sleeve gastrectomy</i>)
MAC	<i>mitochondrial apoptosis-induced channel</i>
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkináza
MCP-1	monocyty přitahující protein 1 (<i>Monocyte chemoattractant protein 1</i>)
MCR	metabolická clearance
MIF	faktor inhibující migraci makrofágů (<i>macrophage migration inhibitory factor</i>)
MIP-1 β	<i>macrophage inflammatory protein-1β</i>
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MT3	metallothionein 3
NA	nedostupný (<i>not available</i>)
NCEP ATP III	<i>National Cholesterol Education Program Expert Panel and Adult Treatment Panel III</i>
nCLU	jaderná forma clusterinu
NF- κ B	nukleární faktor κ B
NGT	normoglykemická skupina (<i>normal glucose tolerant</i>)
NS	statisticky nevýznamný (<i>not significant</i>)
NTN1	netrin 1

OB-R	receptor pro leptin
PAI-1	inhibitor aktivátoru plazminogenu 1 (<i>plasminogen activator inhibitor-1</i>)
PAMPs	s patogeny asociované molekulární částice (<i>pathogen-associated molecular patterns</i>)
PI3K	fosfatidylinozitol-3-kináza
PPAR γ	<i>peroxisome proliferators-activated receptor γ</i>
RANTES	<i>regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted</i>
RARRES2	<i>retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 2</i>
RCF	relativní centrifugační zrychlení
ROS	volné (reaktivní) kyslíkové radikály (<i>reactive oxygen species</i>)
SAT	podkožní tuková tkáň (<i>subcutaneous adipose- tissue</i>)
sCLU	sekretovaná forma clusterinu
SGP-2	<i>sulfated glycoprotein-2</i>
SH2	<i>Src homology 2</i>
STAT	transducery signálu a aktivátory transkripce (<i>signal transducers and activators of transcription</i>)
sTNF-R1	solubilního receptor pro tumor nekrotizující faktor 1 (<i>soluble tumor necrosis factor receptor 1</i>)
TAG	triglycerid
TIG2	<i>tazarotene-induced gene-2</i>
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNF-R	receptor pro tumor nekrotizující faktor (<i>tumor necrosis factor receptor</i>)
TNF- α	tumor nekrotizující faktor α
TRPM-2	<i>testosterone repressed prostate message-2</i>
VAT	viscerální tuková tkáň (<i>visceral adipose tissue</i>)
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor
VLCD	nízkokalorická dieta (<i>very-low-calorie diet</i>)
VLDL	lipoprotein s velmi nízkou hustotou (<i>very-low density lipoprotein</i>)
VMK	volné mastné kyseliny
WHO	Světová zdravotnická organizace (<i>World Health Organization</i>)

Abstrakt

Obezita, inzulínová rezistence a další asociované komorbidity představují pro pacienty značné zdravotní riziko. Mírný chronický zánět tukové tkáně je považován za jednu z hlavních příčin jejich vzniku. V této práci jsme se zaměřili na dva rozdílné přístupy s předpokládaným potenciálem k pozitivnímu ovlivnění zánětu v tukové tkáni – léčebnou hypotermii a adipokin clusterin.

V první části práce jsme ukázali, že perioda hluboké hypotermie spojená s anoxickou fází během kardiochirurgické operace významně zpozdila nástup operací vyvolané systémové zánětlivé reakce. Relativní genová exprese zkoumaných genů nebyla během hypotermní periody změněna, na konci operace ale u pěti z deseti zkoumaných genů (IL-6, MCP-1, TNF- α , HIF1- α , GLUT1) došlo k jejímu významnému zvýšení a u dvou naopak k poklesu (IRS1, GPX1). Z toho usuzujeme, že hluboká hypotermie vedla k oddálení vzniku lokální hypoxie a zánětu v tukové tkáni. Tyto výsledky mohou alespoň částečně vysvětlit pozitivní vlivy hluboké hypotermie na pooperační morbiditu a mortalitu u kardiochirurgických pacientů.

V druhé části práce jsme pak zkoumali plazmatické koncentrace a mRNA exprese clusterinu v subkutánní tukové tkáni a jejich změny dané inzulínovou rezistencí a obezitou. Zabývali jsme se také vlivem vybraných intervencí vyvolávajících váhovou redukci zahrnujících nízkokalorickou dietu a bariatrickou chirurgii (sleeve gastrektomie). Plazmatické koncentrace clusterinu se nelišily mezi zdravými jedinci a obézními pacienty s nebo bez diabetes mellitus 2. typu (DM2) a krátkodobou váhovou redukcí byly ovlivněny jen částečně. Na druhou stranu mRNA exprese clusterinu v podkožní tukové tkáni byla vyšší u obézních pacientů s i bez DM2 v porovnání se zdravými štíhlými subjekty, přičemž k jejímu poklesu došlo po bariatrické operaci, ale ne po krátkodobé nízkokalorické dietě. mRNA exprese clusterinu pozitivně korelovala s markery obezity, sérovými triglyceridy, hladinami inzulínu na lačno, HOMA-IR indexem a koncentracemi CRP. Plazmatické koncentrace clusterinu se neměnily vlivem hyperinzulinemického euglykemického clampu a nekorelovaly s indexem inzulínové senzitivity. mRNA exprese clusterinu v tukové tkáni se vlivem akutního podávání inzulínu a glukózy měnila pouze u jedinců bez inzulínové rezistence. Celkově naše výsledky ukazují, že se clusterin pravděpodobně nepodílí na systémové regulaci energetické homeostázy, může ale mít lokální regulační úlohu v tukové tkáni.

Klíčová slova: Tuková tkáň, subklinický zánět, inzulínová rezistence, hypotermie, clusterin.

Abstract

The cluster of obesity, insulin resistance and other associated comorbidities represents a significant health risk for the affected individuals as well as the whole population. Chronic low-grade inflammation of adipose tissue is considered one of the main mechanisms responsible for the progression from simple obesity to a fully developed metabolic syndrome. The aim of our study was to explore two different approaches that could potentially ameliorate adipose tissue inflammation – therapeutic hypothermia and the adipocytokine clusterin.

In the first part, we showed that a period of deep hypothermia associated with the anoxic phase of cardiac surgery significantly delayed the onset of systemic inflammatory response induced by surgery. The relative gene expression of the studied genes was not altered during the hypothermic period, but was significantly increased in five out of ten studied genes (IL-6, MCP-1, TNF- α , HIF1- α , GLUT1) and decreased in two genes (IRS1, GPX1) at the end of surgery. We conclude that deep hypothermia delays the onset of local adipose tissue hypoxia and inflammation. These results could partially explain the positive effects of therapeutic deep hypothermia on postoperative morbidity and mortality in cardiac surgery patients.

In the second part, we examined plasma levels and mRNA expression of the adipocytokine clusterin in subcutaneous adipose tissue and its relation to insulin resistance and obesity. We also evaluated the influence of selected weight reducing interventions including very low-calorie diet (VLCD) and bariatric surgery (sleeve gastrectomy). Plasma clusterin levels did not differ between healthy individuals and obese patients with or without type 2 diabetes mellitus (DM2) and were affected only partially by short-term weight reduction. On the other hand, mRNA expression of clusterin in subcutaneous adipose tissue was higher in obese subjects with and without DM2 compared to healthy lean subjects and it decreased after bariatric surgery, but not after VLCD. Clusterin mRNA expression was positively associated with markers of obesity, serum triglycerides, fasting insulin, HOMA-IR index and concentrations of CRP. Plasma clusterin levels were not influenced by hyperinsulinemic euglycemic clamp (HEC) and did not correlate with insulin sensitivity index. mRNA expression of clusterin was elevated at the end of HEC compared to baseline only in the normoglycemic, but not in the IGT or T2DM patients. In summary, our data suggest a possible local regulatory role for clusterin in the adipose tissue rather than its systemic involvement in the regulation of energy homeostasis.

Key words: Adipose tissue, subclinical inflammation, insulin resistance, hypothermia, clusterin.

1. Úvod

Celosvětová pandemie obezity je palčivý problém moderní doby charakteristické sedavým způsobem života a nadměrným příjmem potravy s vysokým zastoupením tuků a cukrů. Její prevenci je sice věnována velká pozornost, ovšem s malým úspěchem. Množství lidí s nadváhou nebo přímo obezitou naopak každoročně přibývá a spolu s ním roste i prevalence metabolického syndromu, který sdružuje komorbidity s obezitou často asociované jako jsou diabetes mellitus 2. typu, dyslipidémie, arteriální hypertenze a další (Reaven 1988). Uvedená kombinace metabolických poruch pak u pacientů s obezitou významně zvyšuje riziko kardi-ovaskulární morbidity a mortality. To vše ve výsledku představuje neúnosně rostoucí zátěž pro zdravotní systém. Primární poruchou u metabolického syndromu vedoucí ke vzniku jeho přidružených komplikací je inzulínová rezistence (Žák, Slabý 2009). Objasnění příčin a mechanismů inzulínové rezistence proto představuje cestu k nalezení účinnější léčby těchto civilizačních chorob.

Přesné příčiny vzniku inzulínové rezistence nejsou dosud zcela známy. Předpokládá se, že se na jejím vzniku podílí především odchylky ve funkci tří hlavních metabolicky aktivních tkání – svalové, jaterní, a především tukové tkáně. Právě mírný (subklinický) chronický zánět tukové tkáně, který je typický pro obezitu a k ní přidružené komorbidity, bývá nejčastěji označován za hlavní příčinu vzniku inzulínové rezistence. Studium zánětu v tukové tkáni tak představuje možnou cestu, jak vyvinout účinnou léčbu proti metabolickému syndromu a s ním spojenými komorbiditami, jako jsou arteriální hypertenze, dyslipidémie, diabetes mellitus 2. typu, viscerální obezita a další.

V této práci jsme si dali za cíl blíže prozkoumat mechanismy, které by mohly přispět k potlačení rozvoje zánětu tukové tkáně, případně by pomohly tento patofyziologický proces zpomalit či úplně zastavit. Zaměřili jsme se na dva přístupy, které s touto problematikou souvisejí. Zprvu se jednalo o hlubokou hypotermii a její potenciální schopnost potlačovat zánět v tukové tkáni způsobený operačním výkonem a následky hypoxie, které jsou pacienti při kardiologické operaci vystaveni. Dále jsme se rozhodli věnovat clusterinu, tedy faktoru majícímu v organismu celou řadu funkcí včetně možného ovlivnění regulace zánětu a inzulínové rezistence.

2. Metabolický syndrom

Metabolický syndrom byl poprvé popsán v roce 1988 Reavenem (Reaven 1988) jako tzv. Syndrom X. Jedná se o soubor rizikových faktorů, které společně až třikrát zvyšují riziko vzniku kardiovaskulárních komplikací. Pravděpodobnost vzniku diabetes mellitus 2. typu (DM2) je u pacientů s metabolickým syndromem zvýšena dokonce až pětkrát (Stern *et al.* 2004).

Dle definice NCEP ATP III z roku 2001 (National Cholesterol Education Program Expert Panel and Adult Treatment Panel III) (NCEP 2001), trpí pacient metabolickým syndromem, jestliže splňuje alespoň tři z následujících kritérií:

- abdominální obezita: obvod pasu ≥ 102 cm pro muže a ≥ 88 cm pro ženy
- zvýšená hladina triglyceridů: $\geq 1,7$ mmol·l⁻¹
- snížená hladina HDL cholesterolu: $< 1,03$ mmol·l⁻¹ u mužů a $< 1,29$ mmol·l⁻¹ u žen
- arteriální hypertenze: systolický krevní tlak ≥ 130 mmHg nebo diastolický krevní tlak ≥ 85 mmHg
- zvýšená glykémie na lačno ($\geq 5,6$ mmol·l⁻¹) nebo diagnostikovaný diabetes mellitus 2. typu

Podle druhé často používané definice, dle Mezinárodní diabetologické federace (International Diabetes Federation, IDF) z roku 2005 (Federation 2005), je pro metabolický syndrom nutná přítomnost abdominální obezity, jejíž kritéria jsou navíc pro evropskou populaci zpřísněna na obvod pasu ≥ 94 cm pro muže a ≥ 80 cm pro ženy. Dále musí pacient splňovat alespoň dvě z výše zmíněných kritérií nebo na ně být léčen.

Používání různých definicí značně komplikuje porovnání výskytu metabolického syndromu v jednotlivých zemích. Například ve studii, která porovnávala prevalenci metabolického syndromu v Bangladéši na základě jeho různých definic, došli k hodnotě 30,7 % dle NCEP ATP III a 24,5 % dle IDF, tedy rozdíl v prevalenci jen na základě různé metodiky byl 6,2 procentních bodů (Bhowmik *et al.* 2015). Bez ohledu na použitou definici zůstává faktem, že celosvětový výskyt metabolického syndromu neustále stoupá především v souvislosti s nárůstem obezity a stárnutím populace (Grundy 2008). Zároveň kontinuálně roste i počet diabetiků – zatímco v roce 2005 se v České republice na 100 tisíc obyvatel léčilo pro diabetes 7212 pacientů, v roce 2013 to již bylo 8196 pacientů (ÚZIS 2015).

Příčiny metabolického syndromu nejsou zatím zcela objasněny. Na jeho vzniku se ovšem nepochybně podílí jak genetické predispozice, tak vnější faktory, tedy především strava a životní styl. Za hlavní patofyziologickou příčinu metabolického syndromu pak bývá považována inzulínová rezistence a viscerální obezita (Žák, Slabý 2009).

2.1. Obezita

Dle údajů Světové zdravotnické organizace (WHO) mělo v roce 2014 39 % dospělé populace, tedy přes 1,9 miliardy lidí, nadváhu. Z toho obézních bylo více jak 600 milionů lidí, což představuje 13 % dospělé populace a tato čísla neustále stoupají. V České Republice bylo v roce 2008 obézních 17,3 % mužů a 17,5 % žen, nadváhu pak mělo dokonce 45,2 % mužů a 29 % žen. Novější údaje nejsou v současné době k dispozici, ale předpokládá se ještě vyšší výskyt (Láchová, Daňková 2013).

Obezita je definována jako nadměrné ukládání tuku v organismu dané dlouhodobou převahou energetického příjmu nad výdejem. Pro evropskou bělošskou populaci bývá nejčastěji definována jako zvýšení indexu tělesné hmotnosti (body mass index, BMI) nad 30 kg/m². Dle BMI rozlišujeme několik kategorií obezity, které jsou spojeny s různou mírou rizika přidružených komplikací (tabulka 1). Existuje celá řada metod (stanovení poměru pasu a boků, bioimpedance, DEXA a další), které dávají přesnější představu o množství a zastoupení tuku v organismu. Ty jsou většinou časově nebo finančně náročnější než prostý výpočet BMI, a proto bývají používány převážně jen pro výzkumné účely.

Tabulka 1: Klasifikace tělesné hmotnosti podle BMI s uvedením zdravotních rizik (Hainer, Kunešová 1997).

BMI (kg/m ²)	Kategorie	Zdravotní riziko
< 18,5	Podvýživa	Vysoké
18,5 – 24,9	Normální hmotnost	Minimální
25 – 29,9	Nadváha	Nízké
30 – 34,9	Obezita 1. stupně	Vysoké
35 – 39,9	Obezita 2. stupně	Vysoké
> 40	Obezita 3. stupně	Velmi vysoké

Rozlišujeme dva základní typy obezity – androidní a gynoidní. Gynoidní typ je charakteristický ukládáním tuků především v oblasti boků a hýždí. Jedná se převážně o zmnožení podkožního, tedy metabolicky méně škodlivého tuku. Oproti tomu v případě androidní obezity je tuk ukládán primárně v oblasti břicha a hrudníku. Dochází tak hlavně k nárůstu vysoce metabolicky aktivního útrobního neboli viscerálního tuku, což bývá spojeno s vyšším výskytem metabolických a kardiovaskulárních komplikací obezity (Abate *et al.* 1996; Despres

1993). Na více než třech tisících účastníků Framinghamské studie (The Framingham Heart Study), kteří byli sledováni po období s mediánem 5 let, bylo prokázáno, že viscerální obezita je spojena s vyšším rizikem kardiovaskulárních příhod a s vyšším výskytem zhoubných nádorů, a to nezávisle na celkovém obsahu tuku v organismu a klinických rizikových faktorech (Britton *et al.* 2013).

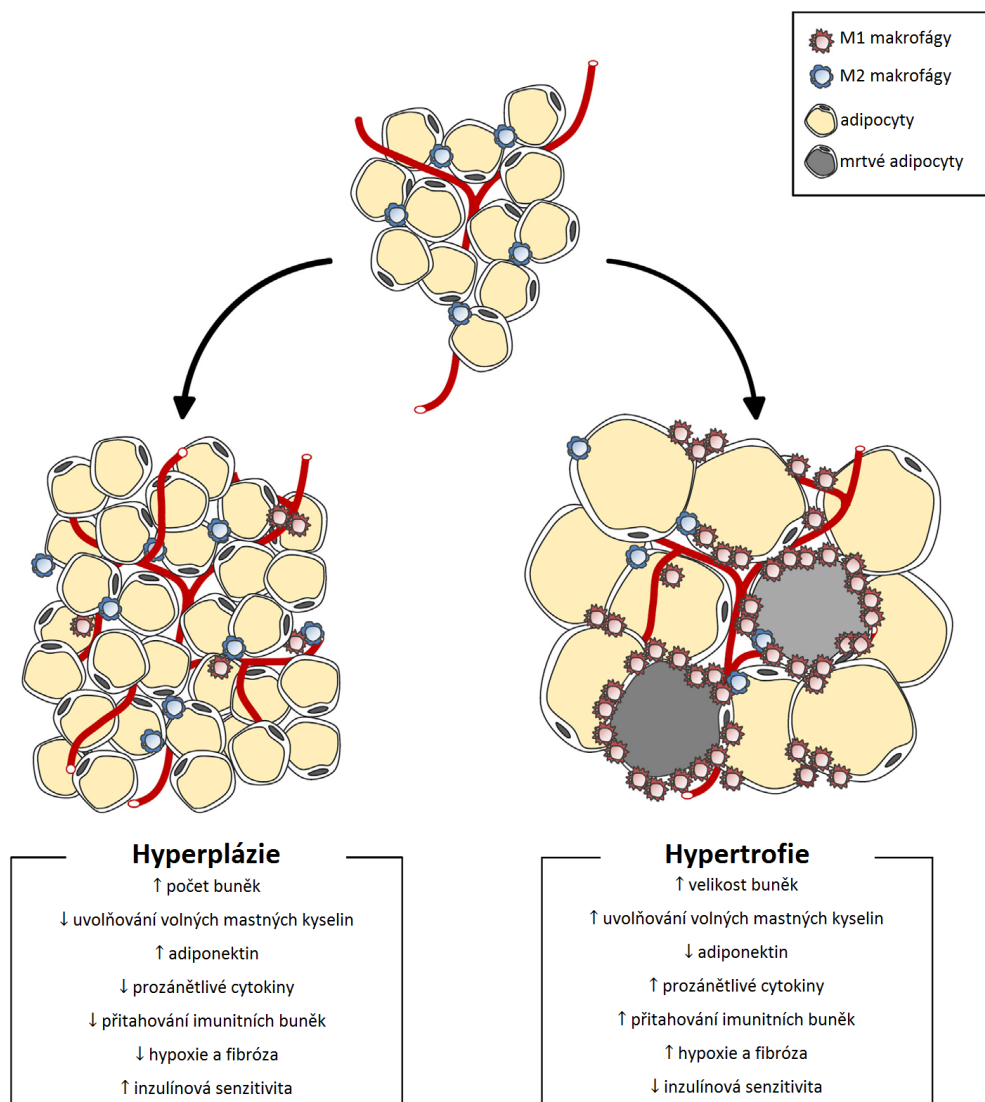
Energie přijímaná potravou je v organismu metabolizována a její přebytky jsou uloženy ve formě triglyceridů (TAG) a glykogenu. Jednou z hlavních funkcí tukové tkáně je udržování energetické homeostázy, tedy vychytávání přebytečných TAG z oběhu při příjmu potravy, a naopak uvolňování mastných kyselin a glycerolu při hladovění. Množství adipocytů zůstává i přes poměrně rychlou obměnu po celý dospělý život v podstatě konstantní – ročně dochází k obměně přibližně 10 % adipocytů. Množství i rychlost obměny a tvorby nových adipocytů se neliší mezi štíhlými a obézními jedinci. Při obezitě tedy nedochází ke zmnožení buněk, ale k jejich hypertrofii díky zvýšenému ukládání TAG (Spalding *et al.* 2008). Množství lipidů, které může být uloženo do tukové tkáně, je omezené. Při obezitě dochází postupně k tzv. ektopickému ukládání tuku – tj. ukládání lipidů mimo tukovou tkáň do jiných orgánů – především do kosterního a srdečního svalstva (Forouhi *et al.* 1999; Pan *et al.* 1997) a jater (Banerji *et al.* 1995; Sethi, Vidal-Puig 2007). Ukládání TAG v buňkách orgánů, které k tomu nejsou primárně uzpůsobeny, vede k rozvoji inzulínové rezistence interferencí takto uložených lipidů s intracelulární inzulínovou signální kaskádou (játra, sval) případně ke zhoršení inzulínové sekrece a zvýšené apoptóze beta-buněk pankreatu (Ravussin, Smith 2002).

Obezita je spojena se zvýšenou infiltrací imunokompetentních buněk, především makrofágů a lymfocytů, do tukové tkáně. Zároveň dochází k poklesu zastoupení regulačních T buněk. Aktivované imunitní buňky spolu s adipocyty ve zvýšené míře produkují prozánětlivé cytokiny, což významně přispívá ke vzniku mírného chronického zánětu v tukové tkáni. Pro tento typ zánětu, označovaného jako subklinický, je typická zvýšená produkce prozánětlivých faktorů (především tumor nekrotizující faktor α (TNF- α), interleukin (IL) -1 β a -6, avšak bez přítomnosti klinických příznaků zánětu. Subklinický zánět v tukové tkáni dále přispívá k rozvoji inzulínové rezistence a diabetes mellitus 2. typu (Sethi, Vidal-Puig 2007; Wellen, Hotamisligil 2003).

Přestože je obezita spojená s celou řadou komorbidit a pro organismus je primárně škodlivá, nemusí tomu tak být vždy. V posledních letech je stále více diskutován tzv. paradox obezity, kdy pacienti s nižším BMI mají při operacích vyšší úmrtnost než pacienti s BMI

vyšším. Tento zvláštní fenomén byl poprvé popsán v práci Gruberga et al. (Gruberg *et al.* 2002), která se zaměřovala na určení vlivu BMI na krátkodobou a dlouhodobou prognózu pacientů s ischemickou chorobou srdeční po provedení angioplastiky. Nejvyšší riziko časných komplikací a zvýšenou mortalitu v prvním roce po zákroku měli pacienti s normálním nebo velmi nízkým BMI. Tento závěr byl potvrzen i metaanalýzou 40 studií na více než 250 tisících pacientech, ve které měli nejnižší kardiovaskulární i celkovou mortalitu pacienti s nadváhou a obézní pacienti neměli významně zvýšenou mortalitu. Pacienti s BMI $\geq 35 \text{ kg/m}^2$ měli nejvyšší kardiovaskulární, i když ne celkovou mortalitu (Romero-Corral *et al.* 2006). Existence paradoxu obezity byla potvrzena i u pacientů s hypertenzí a ischemickou chorobou srdeční (Uretsky *et al.* 2007), po infarktu myokardu (Bucholz *et al.* 2012) nebo s chronickým srdečním selháním (Kalantar-Zadeh *et al.* 2004). V poslední době se ukazuje, že tento paradox by mohl platit nejen u kardiovaskulárních, ale i celé řady dalších chronických chorob, i když ne všechny studie toto potvrzují. V dánské studii (Lainscak *et al.* 2012) porovnávající celkovou mortalitu za poslední tři dekády celkem u téměř sto tisíc subjektů zjistili, že hodnota BMI spojovaná s nejnižší mortalitou postupně roste. V letech 1976-1978 bylo BMI asociované s nejnižší mortalitou o 3,3 nižší, než v letech 2003-2013. Vysvětlení tohoto jevu nicméně zůstává nejasné (Afzal *et al.* 2016).

Zdá se, že paradox obezity by mohl platit do jisté míry i u diabetiků. Prospektivní studie zjistila nejnižší relativní riziko úmrtí u diabetiků s BMI 25,0-29,9 kg/m^2 pro bílou populaci a dokonce 30,0-34,9 kg/m^2 u Afroameričanů (Zhao *et al.* 2014). To je velmi překvapivé zjištění vzhledem k tomu, že u diabetiků je významně zvýšena pravděpodobnost kardiovaskulární příhody – riziko infarktu myokardu nebo náhlé srdeční smrti během 10 let je u nich 20 % (Juutilainen *et al.* 2005; NCEP 2002). U diabetiků s preexistujícím srdečním onemocněním (pacienti ze studie PROactive) byla dokonce nejenže zjištěna snížená morbidita a mortalita u pacientů s nadváhou a obezitou oproti pacientům s normální váhou, ale navíc ještě další pokles těchto ukazatelů s nárůstem tělesné hmotnosti během následujícího 34,5 měsíce dlouhého sledování (Doehner *et al.* 2012). Bohužel přesné mechanismy stojící za tímto fenoménem zatím nejsou známy. Pro hlubší porozumění tomuto problému by bylo potřeba znát u pacientů nejen BMI, ale i skutečné množství a distribuci tukové tkáně.



Obrázek 1: Hyperplázie a hypertrofie adipocytů.
 Upraveno podle (Choe *et al.* 2016)

2.2. Inzulínová rezistence

Inzulínová rezistence (IR) je stav, kdy normální nebo dokonce zvýšená hladina inzulinu v krvi vede k nedostatečné odpovědi organismu. Jedná se tedy o poruchu účinku inzulinu (Lann, LeRoith 2007). Ta může být způsobena morfologickou nebo funkční poruchou inzulinového receptoru nebo některé z postreceptorových složek inzulinové signální kaskády. Projevuje se v tukové tkáni, kosterním svalstvu, játrech a centrálním nervovém systému. Může se vyskytovat jak u pacientů s obezitou, tak u jedinců s normální váhou. Nejčastěji je však asociována s centrální obezitou a dalšími složkami metabolického syndromu. Za jednu z důležitých příčin jejího vzniku je obecně považován zánět v tukové tkáni (Rasouli, Kern 2008).

2.2.1. Vznik inzulínové rezistence

Inzulínová rezistence vzniká na základě široké škály příčin. Genetická predispozice způsobující inzulínovou rezistenci je velmi vzácná. Může se jednat jak přímo o mutace genu pro inzulínový receptor, tak pro některé další složky inzulínové signální kaskády. Výrazně častější jsou takzvané sekundární příčiny vzniku IR, mezi které řadíme vznik protilátek proti inzulínovému receptoru, hormonální příčiny, a především metabolické faktory. Mezi ty řadíme nedostatečnou fyzickou aktivitu, kouření, medikaci, hyperglykémii a především obezitu a s ní související zvýšenou hladinu volných mastných kyselin (Pelikánová, Bartoš 2011).

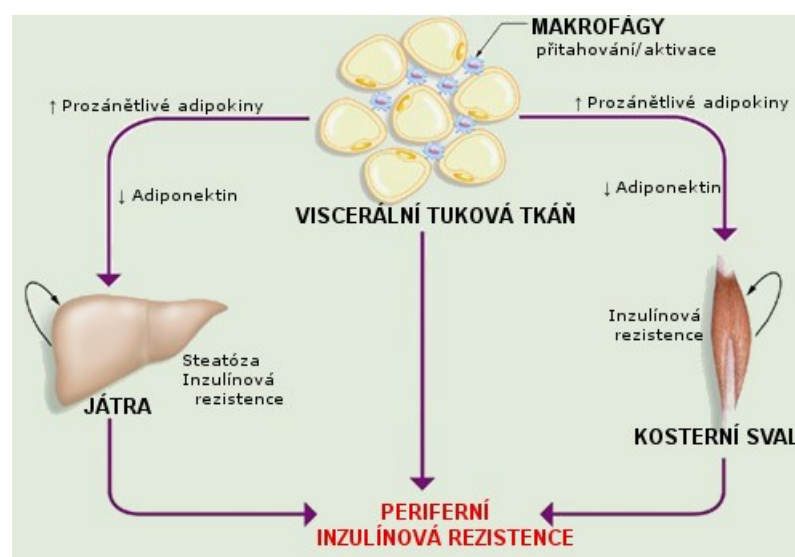
Ektopické ukládání tuků do svalu, jater a pankreatu je typickým jevem doprovázejícím IR. Zvýšená koncentrace lipidů v těchto tkáních přímo ovlivňuje inzulínovou signální kaskádu, a to na postreceptorové úrovni. Výsledkem je snížená senzitivita těchto tkání na inzulín (Saltiel, Olefsky 1996). Hovoříme o takzvané lipotoxicitě.

V adipocytech a dalších buňkách vystavených nadměrnému množství nutrientů dochází k modifikaci intracelulárních proteinů, k poruše funkce endoplazmatického retikula (ER) a buněčné membrány a k poruše funkce mitochondrií a z toho plynoucímu vzniku oxidačního stresu (Landini *et al.* 2016; Odegaard, Chawla 2013). Buněčná dysfunkce vede k aktivaci celé řady stresem indukovaných a regulačních signálních drah, jež následně inhibují inzulínovou signální kaskádu, což vede k potlačení funkce inzulínu. Například obezitou vyvolaný stres ER vede k nadměrné aktivaci c-Jun-N-terminální kinázy (JNK) a následně serinové fosforylaci substrátu inzulínového receptoru (IRS) 1. Chronický stres ER při obezitě tak přímo vede ke vzniku inzulínové rezistence (Nakatani *et al.* 2005; Ozcan *et al.* 2004).

S rostoucí velikostí adipocytů dochází ke zvýšení produkce většiny adipokinů podílejících se na vzniku prozánětlivého stavu a inzulínové rezistence, a naopak ke snížení produkce pozitivně působících adipokinů nebo k rezistenci na tyto pozitivní účinky. To dále vede k prohloubení metabolických komplikací (Maury, Brichard 2010; Skurk *et al.* 2007). Tyto změny mohou být částečně vysvětleny stresovou reakcí hypertrofovaných adipocytů na hypoxické podmínky. S jejich rostoucí velikostí totiž roste vzdálenost, kterou k nim musí kyslík difundovat skrze tkáň a jeho dostupnost pro buňky tak klesá (Hosogai *et al.* 2007). Při obezitě dochází v tukové tkáni také k poruše funkce extracelulární matrix, především kolagenu VI, což vede ke zvýšené chemotaxi makrofágů a dalšímu zvýšení produkce zánětlivých cytokinů (Khan *et al.* 2009; Pasarica *et al.* 2009). Myši s poruchou kolagenu VI jsou ale i přes obezitu metabolicky zdravější. To je dáno pravděpodobně skutečností, že díky nefunkčnímu kolagenu

jsou adipocyty při svém růstu vystaveny menšímu mechanickému tlaku okolí, a proto méně odumírají (Khan *et al.* 2009).

Velká pozornost je věnována vlivu volných mastných kyselin (VMK) na IR. Jedním z mechanismů, kterým VMK způsobují inzulinovou rezistenci, je snížení aktivity glukózového transportéru (GLUT) 4. Tím dochází ke snížení inzulinem stimulovaného transportu do buněk svalové tkáně (Shulman 2000). Další cestou, kterou VMK inhibují inzulinovou signální kaskádu je fosforylace serinu v IRS1 (Gao *et al.* 2004; Yu *et al.* 2002). Fosforylace IRS1 vede buď k porušení interakce s inzulinovým receptorem (Aguirre *et al.* 2002) nebo přímo k degradaci IRS1 (Lee *et al.* 2003b). VMK přes diacylglycerol nebo ceramid aktivují izoenzymy proteinkinázy C, což vede k aktivaci signálních drah kináz JNK a IKK β . Jejich aktivace vede k fosforylaci serinu v IRS1 a zároveň i vzniku, případně zesílení zánětu v tukové tkáni a svalu (Aguirre *et al.* 2000; Gao *et al.* 2004; Odegaard, Chawla 2013). Vzhledem k tomu, že prozánětlivý cytokin TNF- α vyvolává fosforylaci serinu v IRS1 (Aguirre *et al.* 2000; Nguyen *et al.* 2005), dochází ještě pozitivní zpětnou vazbou k další blokaci inzulinové signální dráhy.



Obrázek 2: Schéma zapojení tukové, kosterní a jaterní tkáně při vzniku inzulinové rezistence.
Upraveno podle (Claria *et al.* 2011).

2.2.2. Vliv inzulinové rezistence na organismus

V tukové tkáni je vlivem inzulinové rezistence chronicky zvýšená lipolýza kvůli poruše inhibice hormon senzitivní lipázy a díky tomu rostou hladiny VMK (Odegaard, Chawla 2013). Zvýšená hladina VMK vede k poklesu extrakce inzulinu jaterními buňkami (Wiesenthal *et al.* 1999) a následně ke zvýšené produkci glukózy játry (Fanelli *et al.* 1993; Lewis *et al.* 1997), která se podílí na rozvoji hyperglykémie a hyperinzulinémie. Toto

experimentálně prokázali Boden et al. (Boden *et al.* 1991) ve své práci, v níž hyperlipidémie způsobená infuzí lipidů s heparinem vyvolala akutní inzulinovou rezistenci vedoucí k hyperinzulinémii. Ta byla opět normalizována po ukončení infuze. Kromě toho při inzulinové rezistenci dochází v tukové tkáni také ke změnám produkce adipokinů, jak bude popsáno dále.

V játrech stoupá při IR produkce glukózy zvýšenou stimulací lipolýzy, glykogenolýzy a glukoneogeneze, což vede k hyperglykémii (Odegaard, Chawla 2013; Pelikánová, Bartoš 2011). *In vitro* bylo na hepatocytech prokázáno, že inzulin má za přítomnosti prozánětlivých cytokinů dvojitý efekt na expresi transkripčního nukleárního faktoru κB (NF- κB), který hraje roli v regulaci zánětu, koagulace a fibrolýzy. Při šestihodinovém, tedy krátkodobém, vystavení hyperinzulinémii, potlačuje inzulin aktivitu NF- κB , a to pravděpodobně přes signální dráhu fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K). Při dlouhodobém vystavení ovšem naopak přes dráhu mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK) aktivitu NF- κB zvyšuje. Za fyziologických podmínek, kdy je inzulin v těle vždy krátkodobě zvýšen, působí protizánětlivě. Při IR ovšem dochází k dlouhodobému zvýšení hladin inzulinu, což má naopak prozánětlivý účinek (Iwasaki *et al.* 2009).

Kosterní sval je u zdravých lidí hlavním místem utilizace glukózy. Postprandiální zvýšení glykémie stimuluje inzulinovou sekreci v pankreatu. Takto zvýšená hladina inzulinu v krvi vede ke zvýšení vstupu glukózy do svalových buněk, čímž je opět vyrovnána hladina glykémie (DeFronzo 2004). Při IR dochází k poklesu inzulinem stimulovaného transportu glukózy do buněk a koncentrace glukózy v krvi proto stoupá. Příčinou může být přímo poškození inzulinové signální kaskády (Cusi *et al.* 2000), transportu glukózy pomocí glukózových přenašečů (Abel *et al.* 2001) nebo porucha utilizace glukózy v buňce a syntéza glykogenu.

Snížená produkce a účinnost inzulinu vede v cévním endotelu k vazokonstrikci a následně arteriální hypertenzi, protože inzulin za fyziologických podmínek vyvolává PI3K-dependentní produkci oxidu dusnatého a vazodilataci (Muniyappa *et al.* 2008).

Při inzulinové rezistenci ztrácejí alfa-buňky pankreatu citlivost na účinky inzulinu. Hladina glukagonu tak přestává být regulována inzulinem a jeho hladiny v organizmu rostou. U pacientů s diabetes mellitus 2. typu je zvýšená hladina glukagonu jak na lačno, tak postprandiálně, a to i při normálních hladinách inzulinu (Reaven *et al.* 1987). Díky

hyperglukagonemii se zvyšuje jaterní produkce glukózy, což přispívá k hyperglykémii (Lee *et al.* 2014).

U zdravého člověka reagují beta-buňky pankreatu na vystavení zvýšené hladině glukózy zvýšenou glukózou stimulovanou sekrecí inzulínu. Ektopické ukládání tuků v Langerhansových ostrůvcích pankreatu má za následek nejdříve hyperplazii beta-buněk (Unger, Orci 2001), avšak zvýšený výskyt lipidů vede až v 50 % k jejich apoptóze (Weiss, Stoffel 1997). Při inzulínové rezistenci tak klesá produkce inzulínu a relativní hypoinzulinémie ještě dále zvyšuje hyperglykémii (Halperin *et al.* 2012).

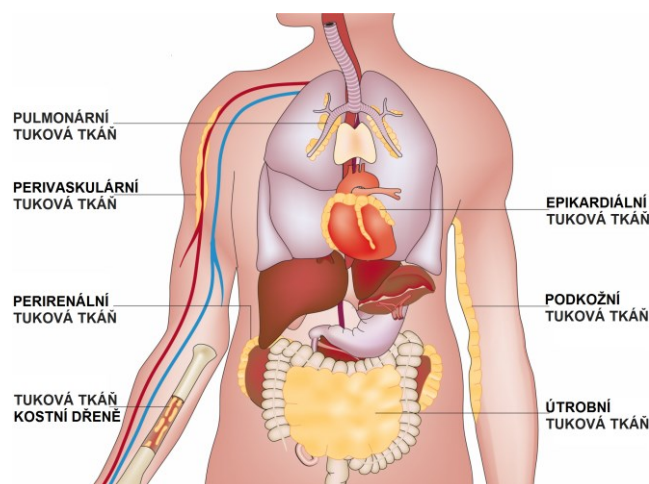
3. Tuková tkáň

Od objevení hormonu leptinu v roce 1994 (Zhang *et al.* 1994) je tuková tkáň považována za metabolicky aktivní orgán produkující celou řadu biologicky aktivních látek označovaných jako adipokiny. Ty mohou působit jak lokálně, tak systémově po uvolnění do krevního oběhu s endokrinním mechanismem působení (Kershaw, Flier 2004).

Tuková tkáň je komplexní orgán tvořený celou řadou různých buněčných typů. Nejvíce jsou zde zastoupeny adipocyty, tedy vlastní buňky tukové tkáně, dále endoteliální a imunokompetentní buňky, nervová vlákna a preadipocyty, které jsou dohromady označovány jako stromavaskulární frakce (Frayn *et al.* 2003; Chaldakov *et al.* 2003). Adipokiny jsou v tukové tkáni tvořeny nejen samotnými adipocyty, ale i složkami stromavaskulární frakce, zejména makrofágy (Fantuzzi 2005).

Existují dva základní typy tukové tkáně – bílá obsahující adipocyty s jedinou tukovou kapénkou (unilokulární buňky) a menším množstvím mitochondrií a hnědá obsahující adipocyty s velkým počtem mitochondrií specializovaných na adaptivní termogenezi. Poslední dobou se navíc spekuluje ještě o tzv. běžovém tuku, tedy o existenci buněk s vlastnostmi hnědých adipocytů, které se vyskytují v bílé tukové tkáni (Spiegelman 2013).

Vlastnosti bílé tukové tkáně se výrazně liší dle její lokalizace. Primárně odlišujeme dva typy tukové tkáně – podkožní (subkutánní, SAT) a útrobní (viscerální, VAT). Viscerální tuková tkáň je umístěna v okolí vnitřních orgánů v břišní dutině a mezihrudí. Dále dle lokalizace rozlišujeme podtypy viscerální tukové tkáně – např. perivaskulární nebo epikardiální.



Obrázek 3: Rozdělení tukové tkáně dle lokalizace. Upraveno podle (Ouchi *et al.* 2011).

Adipokiny jsou viscerálním tukem uvolňovány přímo do portálního systému, mají tedy větší vliv na jaterní metabolismus než adipokiny z podkožního tuku, jež jsou uvolňovány do systémového oběhu (Frayn *et al.* 2003). Viscerální tuk je navíc celkově metabolicky aktivnější. Liší se i poměr adipokinů, které jsou různými typy tukové tkáně uvolňovány do oběhu. Například leptin je více produkován podkožním, zatímco IL-6 a inhibitor aktivátoru plazminogenu 1 (PAI-1) viscerálním tukem. Liší se také reakce na cytokiny a další látky, což je mimo jiné dáno i rozdílnou expresí receptorů na adipocytech v různých tukových depech (Coppack 2001; Kershaw, Flier 2004). Zatímco viscerální tuková tkáň je asociována s rozvojem inzulínové rezistence (Lebovitz, Banerji 2005), podkožní tuková tkáň může mít naopak dokonce protektivní úlohu proti jejímu rozvoji (Tran *et al.* 2008). Epikardiální tuková tkáň pak může přímo negativně lokálně působit na srdce a koronární tepny (Dey *et al.* 2012).

3.1. Zánět tukové tkáně

Zánět tukové tkáně je stav typický pro obezitu, metabolický syndrom a další přidružená onemocnění. Bývá považován za hlavní příčinu vzniku inzulínové rezistence (Rasouli, Kern 2008). Na druhé straně, Asterholm *et al.* (Asterholm *et al.* 2014) ve své studii ukázali, že prozánětlivá signalizace v adipocytech je nezbytná pro remodelaci a růst tukové tkáně.

Mírný chronický zánět tukové tkáně je charakterizován zvýšenými hladinami některých prozánětlivých markerů a proteinů akutní fáze v cirkulaci i v samotné tukové tkáni. Jedná se především o C-reaktivní protein, IL-6, IL-8, TNF- α , haptoglobin, faktor inhibující migraci makrofágů a PAI-1 (Landini *et al.* 2016). Naopak hladina adiponektinu, který má protizánětlivé účinky (Ouchi *et al.* 2000) je u obezity snížena, což může být jednou z příčin vzniku chronického zánětu.

Pochopení mechanismu a příčin zánětu tukové tkáně je klíčové pro vývoj léčby s ním spojených onemocnění.

3.1.1. Vznik zánětu v tukové tkáni

Za hlavní zdroj zánětu v tukové tkáni bývají nejčastěji považovány zde lokalizované makrofágy. Množství makrofágů nebo jim odpovídající zánětlivý expresní profil v tukové tkáni koreluje pozitivně s velikostí adipocytů a BMI (Cancello *et al.* 2005; Weisberg *et al.* 2003), jejich význam pro vznik zánětu tedy při obezitě stoupá. Hypertrofie adipocytů při obezitě vede ke vzniku hypoxie (Ye *et al.* 2007). Jako kompenzační mechanismus dochází k angiogenezi, při které jsou do tukové tkáně přitahovány makrofágy zodpovědné mimo jiné za proces revaskularizace (Pang *et al.* 2008).

V *in vitro* modelech bylo definováno rozdělení makrofágů nejen v tukové tkáni na dva jasně diferencované podtypy – prozánětlivé M1 a protizánětlivé M2. *In vivo* ale u lidí nacházíme spíše celou škálu různě polarizovaných buněk, které se vlastnostmi pohybují mezi těmito dvěma extrémy. K polarizaci na M1 makrofágy, které jsou také někdy označovány jako klasicky aktivované, vede především vystavení interferonu- γ (IFN- γ) a lipopolysacharidu. Zvýšený výskyt M1 makrofágů přispívá ke vzniku inzulínové rezistence, a to především produkcí prozánětlivých cytokinů IL-6, IL-12 a TNF- α . Dalším jejich negativním efektem je produkce volných kyslíkových radikálů (ROS), ke které dochází po aktivaci indukibilní syntázy oxidu dusnatého (Lumeng *et al.* 2007; Mantovani *et al.* 2004). Alternativně aktivované makrofágy, označované jako M2, produkují protizánětlivé cytokiny jako je IL-1RA a IL-10 a hrají úlohu v remodelaci tkání (Gordon 2003). Při obezitě dochází ke zvýšení zastoupení M1 na úkor M2 makrofágů. V tukové tkáni tak vzniká zvýšené množství prozánětlivých cytokinů a ROS, což přispívá ke vzniku inzulínové rezistence. Nalezení faktorů, které by dokázaly změnit polarizaci makrofágů v tukové tkáni z M1 na M2 fenotyp, se zdá být jednou z budoucích možností léčby zánětu tukové tkáně (Lumeng *et al.* 2007) a z něj plynoucích onemocnění.

V tukové tkáni obézních jedinců dochází ve zvýšené míře k zániku adipocytů – apoptóze i nekróze. Frekvence zániku adipocytů koreluje pozitivně s velikostí adipocytů (Cinti *et al.* 2005), inzulínovou rezistencí a expresí prozánětlivých faktorů TNF- α , IL-10 (Strissel *et al.* 2007) a monocytu přitahující protein 1 (MCP-1). Až 90 % makrofágů v bílé tukové tkáni je lokalizováno poblíž nekrotických adipocytů v tzv. „crown-like“ strukturách. Ty jsou vytvářeny u lipidových kapének vznikajících během nekrózy (Cinti *et al.* 2005). Hypertrofie tukové tkáně při obezitě je tedy přímo příčinou vzniku zánětu v tukové tkáni.

U myších modelů, u kterých je porušena tvorba lokální zánětlivé odpovědi v tukové tkáni při obezitě, dochází ke zvýšenému ektopickému ukládání lipidů, rozvoji glukózové intolerance a systémového zánětu (Asterholm *et al.* 2014). Zánět v tukové tkáni by tak mohl být adaptivním mechanismem umožňujícím organismu vyrovnat se s přebytkem nutrientů a nastavením metabolické homeostázy (Asterholm *et al.* 2014; Ye, McGuinness 2013).

Dalším možným vysvětlením vzniku chronického zánětu při obezitě může být skutečnost, že vysoké hladiny volných mastných kyselin vedou k aktivaci Toll-like receptoru (TLR) 4 především na adipocytech, makrofázích a v játrech (Shi *et al.* 2006a; Suganami *et al.* 2007). TLR4 je receptor pro lipopolysacharid a má významnou úlohu v regulaci vnitřní imunity (Takeda *et al.* 2003). Může být aktivován také přímo volnými mastnými kyselinami (Song *et al.* 2006). Jeho aktivace vede přes PI3K a Akt kinázu k aktivaci transkripčních faktorů NF- κ B a p65, což následně vede k expresi cytokinů (TNF- α , IL-6) a cyklooxygenázy-2, které vyvolávají zánět (Lee *et al.* 2003a; Song *et al.* 2006). Tsukumo *et al.* (Tsukumo *et al.* 2007) publikovali výsledky, podle kterých jsou myši s nefunkčním TLR4 chráněny před dietou indukovanou obezitou, inzulinovou rezistencí a aktivací zánětlivých drah IKK β a JNK. Ovšem relevance těchto výsledků je sporná, protože tato publikace byla Americkou diabetologickou společností posléze stažena pro plagiátorství a manipulaci s daty (Tsukumo *et al.* 2016).

Han *et al.* (Han *et al.* 2007) ukázali, že u hypertrofovaných adipocytů dochází přes aktivaci dráhy NF- κ B a PPAR γ (peroxisome proliferators-activated receptor γ) ke zvýšení exprese sérového amyloidu 3, MCP-1 a hyaluronan syntázy 2. Díky tomu jsou do tukové tkáně přitaženy a následně jsou zde udržovány monocyty. Přidání antioxidantů do média ovšem tuto expresi zastavuje (Yeop Han *et al.* 2010). Vystavení 3T3-L1 adipocytů TNF- α (Houstis *et al.* 2006) a VMK vede ke zvýšené tvorbě ROS (Yeop Han *et al.* 2010). Zvýšené hladiny markerů oxidačního stresu spojují stavy organismu spojené se zánětem, jako je sepse, popáleniny, obezita, hladovka, akromegalie a diabetes mellitus (Houstis *et al.* 2006). V závislosti na míře a době vystavení oxidačnímu stresu, typu ROS, buněčném typu a dalších faktorech aktivují ROS různé signální dráhy – JNK, FoxO, MAPK, JAK/STAT, p53, fosfolipázu C (Houstis *et al.* 2006) a hlavní zánětlivou dráhu NF- κ B (Yeop Han *et al.* 2010). Přes aktivaci JNK dráhy pak mohou ROS vyvolávat vznik IR (Houstis *et al.* 2006).

Na vzniku zánětu tukové tkáně se může podílet i střevní mikrobiom, jehož druhové složení je u obézních výrazně chudší než u štíhlých jedinců (Turnbaugh *et al.* 2009). Primárně

se předpokládá, že mikrobiom ovlivňuje vznik zánětu nepřímo pomocí vlivu na množství tukové tkáně (DiSpirito, Mathis 2015). Ukazuje se ale i přímý vliv a to přes tzv. s patogeny asociované molekulární částice (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs). Nejvíce zkoumaným zástupcem PAMPs je lipopolysacharid (LPS), který, jak bylo popsáno výše, vede přes TLR4 ke vzniku zánětu v tukové tkáni. LPS vzniká ve střevě při smrti Gram-negativních bakterií, odkud je transportován do krevního oběhu. Cani et al. (Cani *et al.* 2007) ukázali, že u myši krmených vysokotukovou dietou došlo po 4 týdnech ke 2-3 násobnému zvýšení hladin LPS a zároveň ke zvýšení množství LPS-obsahujících bakterií ve střevě. U normálně krmených myši, kterým byla 2-3 krát zvýšena hladina LPS, došlo po 4 týdnech k nárůstu váhy a změně metabolického profilu odpovídajícímu krmení vysokotukovou dietou a také ke zvýšení hladin zánětlivých markerů (Cani *et al.* 2007).

3.2. Endokrinní funkce tukové tkáně

Nejen tuková tkáň, ale i kosterní sval, játra a imunokompetentní buňky produkují řadu biologicky aktivních látek, především prozánětlivé cytokiny jako jsou TNF- α nebo IL-6, čímž přispívají k rozvoji inzulínové rezistence a metabolického syndromu. Metabolismus a molekulární dráhy, které spojují mírný chronický zánět v tukové tkáni a patofyziologické stavy v dalších orgánech (játra a sval) se vznikem inzulínové rezistence a dalších komorbidit nejsou zatím plně pochopeny. Z tohoto důvodu je důležité stále hledat nové faktory, které se mohou na uvedených regulacích často i zásadním způsobem podílet.

3.2.1. Clusterin

Clusterin je heterodimerický glykoprotein o molekulové hmotnosti 70-80 kDa, který byl poprvé izolován v roce 1983 jako protein schopný agregovat suspendované Sertoliho buňky do shluků – clusterů (Blaschuk *et al.* 1983; Fritz *et al.* 1983). Od té doby byl postupně nezávisle izolován v mnoha tkáních pod různými označeními. Nejčastěji je kromě názvu clusterin používán Apolipoprotein J (ApoJ), dále pADHC-9, TRPM-2 (testosterone repressed prostate message-2), SGP-2 (sulfated glycoprotein-2), SP 40,40, CLI (complement lysis inhibitor) a mnoho dalších. Clusterin je exprimován většinou tkání a je obsažen ve všech tělních tekutinách včetně plazmy, mateřského mléka, moči, mozkomíšního moku a semene (Aronow *et al.* 1993; Choi-Miura *et al.* 1992; Kounnas *et al.* 1995). V organismu je mu přisuzována celá řada funkcí – podílí se například na transportu lipidů, inhibici komplementu, regulaci maturace spermií, buněčné migrace a apoptózy (Jenne *et al.* 1991; Trougakos, Gonos 2002). Jeho vyšší hladiny byly zjištěny u Alzheimerovy choroby (Song *et al.* 2012), diabetes mellitus

2. typu, metabolického syndromu a kardiovaskulárních chorob (Trougakos *et al.* 2002). Ovšem jeho hlavní funkce v organismu je stále nejasná. Je možné, že má mnoho různých nezávislých funkcí nebo se naopak jedná o univerzální regulační protein, který by mohl fungovat například jako chaperon chránící buňky před stresem (Humphreys *et al.* 1999).

Z genu pro clusterin vznikají alternativním sestřihem dvě izoformy clusterinu – sekretovaná (označovaná jako sCLU) a jaderná (nCLU). Zdá se, že sCLU podporuje přežívání buněk a přispívá k jejich rezistenci proti celé řadě toxických látek interakcemi s antiapoptotickými proteiny Ku70 a Bax (Djeu, Wei 2009; Chi *et al.* 2008; Moretti *et al.* 2007; Zhang *et al.* 2005). nCLU v reakci na toxickou látku putuje do jádra, kde spouští apoptózu vazbou proteinu Ku70. Tím zvyšuje aktivaci NF- κ B a stimuluje uvolnění proapoptotického Bcl-xL proteinu (Caccamo *et al.* 2005; Leskov *et al.* 2003; Takase *et al.* 2008).

Přibližně 40-60 % clusterinu obsaženého v krevním séru je vázáno na apolipoprotein A-I jako součást lipoproteinu s vysokou hustotou (high density lipoprotein, HDL) (James *et al.* 1991; Jenne *et al.* 1991), může ale být i součástí lipoproteinu s nízkou hustotou (low density lipoprotein, LDL) (Hoofnagle *et al.* 2010; Pettersson *et al.* 2011). Clusterin také tvoří komplexy s leptinem, které se vyskytují buď jako součást HDL nebo jako nelipoproteinová složka séra (Bajari *et al.* 2003). Komplex clusterin-leptin je *in vitro* schopen vazby jak na leptinové, tak na LDL receptory. Clusterin tedy může fungovat jako významný regulátor leptinové aktivity (Bajari *et al.* 2003). Proti této teorii ovšem stojí výsledky Arnolda *et al.* (Arnold *et al.* 2011), kteří na skupině obézních adolescentů před a po váhové redukci zjistili, že pouze 1 % sérového leptinu bylo vázáno na clusterin nebo HDL a sérový clusterin nekoreloval s hladinou leptinu. Poulakou *et al.* (Poulakou *et al.* 2008) dokonce našli negativní korelaci mezi hladinami clusterinu a leptinu i HDL u pacientů se srdeční vadou. U pacientů s kardiovaskulárními chorobami koreluje clusterin s celkovým a LDL cholesterolem, tedy hlavními aterogenními lipidy. Tento vztah je významnější u žen než u mužů (Baralla *et al.* 2015).

V hypothalamu působí clusterin jako anorexigenní faktor potencující účinek leptinu (Byun *et al.* 2011). Aplikace clusterinu do mozku vede u myši k anorexii, poklesu tělesné hmotnosti a k aktivaci hypothalamické STAT3 dráhy, a to přes receptor LDL receptoru příbuzný protein 2 (LRP2, low-density lipoprotein receptor-related protein-2) a dlouhou formu leptinového receptoru (Gil *et al.* 2013). Podání clusterinu ovšem potlačuje příjem potravy i u *ob/ob* myši, které netvoří leptin. Musí zde tedy působit i nějaký na leptinu nezávislý

mechanismus. Tento poznatek je navíc podpořen faktem, že oproti normálním zvířatům mají *ob/ob* myši v hypothalamu zvýšenou expresi clusterinu, pravděpodobně jako mechanismus kompenzující chybějící leptin (Byun *et al.* 2011).

Informace o možné roli clusterinu v regulaci metabolismu tukové tkáně a etiopatogenezi diabetes mellitus 2. typu u lidí jsou kontroverzní. Zatímco v některých studiích měli pacienti s DM2 vyšší sérové koncentrace clusterinu, jež navíc pozitivně korelovaly s hladinou glukózy v krvi (Kujiraoka *et al.* 2006; Trougakos *et al.* 2002), ve studii Poulakou *et al.* (Poulakou *et al.* 2008) nebyl zjištěn rozdíl v hladinách clusterinu mezi zdravými štíhlými jedinci a pacienty s DM2. Diabetici mají navíc oproti zdravým štíhlým jedincům nižší zastoupení clusterinu v HDL (Hoofnagle *et al.* 2010) a naopak vyšší v LDL částicích (Pettersson *et al.* 2011). S ohledem na potenciální kardioprotektivní funkci clusterinu a HDL, může tento jev vést ke zvýšenému kardiovaskulárnímu riziku u pacientů s DM2 (Hoofnagle *et al.* 2010). Studie na myších s knockoutem genu pro clusterin ukázala, že díky vysokotukové dietě jim přibývá váha a tuková hmota stejně jako normálním zvířatům, ovšem mají vyšší glykémii, hladinu C-peptidu a velikost Langerhansových ostrůvků. Přestože u těchto zvířat nebyla zjištěna přímo zhoršená inzulinová senzitivita v kosterním svalu a játrech, došlo ke zvýšení oxidačního stresu a zánětu, a tedy pravděpodobně i celkovému zhoršení inzulinové rezistence (Kwon *et al.* 2014).

Ani závislost hladin clusterinu na BMI není zcela jasná. Zatímco v některých studiích zjistili autoři bazálně rozdílné hodnoty u štíhlých a obézních lidí (Oberbach *et al.* 2011; Won *et al.* 2014), v jiných pracích žádnou asociaci nenalezli (Arnold *et al.* 2011; Kujiraoka *et al.* 2006; Poulakou *et al.* 2008). Navíc samotný pokles hmotnosti, ať už díky nízkokalorické dietě nebo sleeve gastrektomii, vede k významnému poklesu jeho sérové koncentrace (Arnold *et al.* 2011; Oberbach *et al.* 2011).

Ve studii zkoumající japonskou populaci byla zjištěna silná asociace některých alel genu pro clusterin s DM2 (Daimon *et al.* 2011). V další studii zkoumající pacienty s DM2 a mírnými kognitivními poruchami nenašli autoři u skupin s různými alelami genu pro clusterin rozdíl v plazmatických hladinách clusterinu ani ve výsledcích neuropsychologických testů. Po adjustaci na věk, pohlaví a vzdělání ale měli jedinci s alelou rs11136000TT snížené riziko vzniku mírných kognitivních poruch ve srovnání s jedinci s alelou rs11136000CC (Cai *et al.* 2016). Z výsledku těchto studií je možné usuzovat, že by se clusterin mohl přímo podílet na vzniku diabetu nebo jeho přidružených komplikací. Pro tuto hypotézu ovšem zatím nejsou

jasné důkazy. Z výsledků pokusů na myších potom můžeme usuzovat, že by jeho role ve vztahu k inzulinové rezistenci měla být primárně protektivní.

3.2.2. Netrin-1

Primární úlohou netrinu-1 v organismu je vedení axonů při tvorbě centrální nervové soustavy. Jeho funkce je zprostředkována prostřednictvím 3 typů receptorů – integrinu, DCC (deleted in colorectal cancer) a Unc5 (Hebrok, Reichardt 2004). Yebra et al. ve své práci v roce 2003 (Yebra *et al.* 2003) popsali, že vazba netrinu-1 na integriny reguluje migraci epitelálních buněk při tvorbě pankreatu během embryogeneze a teoreticky se může podílet i na tvorbě jiných epitelů. Následně bylo zjištěno, že netriny *in vitro* stimulují proliferaci, migraci a zaujmutí formace lidských endoteliálních buněk (Wilson *et al.* 2006). Dále se podílejí na migraci buněk a buněčné interakci při tvorbě celé řady orgánů včetně svalů a pankreatu (Lai Wing Sun *et al.* 2011). Zdá se ovšem, že se podílejí i na udržení buněčných interakcí v již zralých tkáních. Netrin-1 v *in vivo* modelu ischemie urychluje neovaskularizaci a dokáže zvrátit neuropatii a vaskulopatii v modelu diabetické myši (Wilson *et al.* 2006). Podporuje přežívání dospělých beta-buněk pankreatu snížením aktivity kaspázy-3 při hyperglykémii (Yang *et al.* 2011), což ukazuje jeho potenciální využití v léčbě především diabetes mellitus 1. typu. Podávání netrinu-1 má *in vitro* stimulační efekt na sekreci inzulinu díky zvýšení vstupu Ca^{2+} a zvýšené produkci cAMP v beta-buňkách pankreatu (Gao *et al.* 2016).

U potkanů a myší s diabetem a hypertenzí je netrin-1 v moči významně zvýšen oproti kontrolním zvířatům, a to již v časném stádiu poškození ledvin (White *et al.* 2013). U diabetiků byla zjištěna signifikantně zvýšená močová koncentrace netrinu-1 oproti kontrolní skupině, ať už se jednalo o pacienty s normální albuminurií, mikroalbuminurií nebo nefropatií (Ay *et al.* 2016; Jayakumar *et al.* 2014). Z toho lze usuzovat, že netrin-1 by mohl sloužit jako vhodný marker počínajícího chronického onemocnění ledvin.

V souvislosti s obezitou a inzulinovou rezistencí je zatím v literatuře o netrinu-1 k dispozici pouze velmi málo informací. Ramkhelawon et al. ve své studii z roku 2014 (Ramkhelawon *et al.* 2014) zjistili, že exprese netrinu-1 v tukové tkáni u myší krmených vysokotukovou dietou významně stoupá, sérové koncentrace se ovšem neliší, což by ukazovalo na lokální roli v tukové tkáni. Ve studiích na lidech i myších byly také zaznamenány jeho vyšší exprese u obézních oproti štíhlým, přičemž primárním zdrojem zde byla stromavaskulární složka tukové tkáně. Autoři spekulují nad možností, že úlohou netrinu-1 je udržení makrofágů v tukové tkáni, a to přes receptor Unc5, který blokuje jejich migraci.

Plazmatické hladiny netrinu-1 jsou u nově diagnostikovaných DM2 pacientů signifikantně nižší než u zdravých štíhlých jedinců. Jeho hladina je navíc inverzně asociována s HOMA-IR indexem (Homeostasis model assessment - insulin resistance index), glykemií na lačno i postprandiálně, glykovaným hemoglobinem a inzulinem na lačno, tedy s markery inzulinové rezistence a glukózové homeostázy (Liu *et al.* 2016). Netrin-1 je faktor potenciálně ovlivňující subklinický zánět a inzulinovou rezistenci tukové tkáně. Tato hypotéza ovšem musí být ještě potvrzena dalšími studiemi jak na pokusných zvířatech, tak především u lidí.

3.2.3. Glypican-4

Glypicany jsou rodina heparan-sulfátových proteoglykanů, které se vyskytují v buňce vázané na membráně glykosylfosfatidylinositolovou (GPI) kotvou nebo ve volné formě v krevním oběhu (Tamori, Kasuga 2013). Glypican 4 (Gpc4) funguje jako koreceptor pro fibroblastový růstový faktor 2 v neuronech (Hagihara *et al.* 2000) a nízkoafinitní receptor pro endostatin (Karumanchi *et al.* 2001). Je také schopen přímé vazby na inzulinový receptor vedoucí k jeho fosforylaci, a to bez zapojení GPI kotvy (Ussar *et al.* 2012). Jeho funkce v organismu zatím není zcela prozkoumána. Bylo zjištěno, že se podílí na časném vývoji centrální nervové soustavy (Galli *et al.* 2003), tubulů v některých orgánech (Karihaloo *et al.* 2004) a interakcí s inzulinovým receptorem přímo ovlivňuje diferenciaci adipocytů (Ussar *et al.* 2012). Exprimován je v hematopoetických progenitorových buňkách (Siebertz *et al.* 1999) a pravděpodobně i celou řadou od nich odvozených buněčných typů. V tukové tkáni je exprimován jak stromavaskulární složkou, tak adipocyty (Gesta *et al.* 2006).

mRNA exprese Gpc4 se v tukové tkáni výrazně liší podle lokalizace – u štíhlých lidí je významně vyšší v podkožním než ve viscerálním tuku. Ve studii Gesty *et al.* (Gesta *et al.* 2006) zjistili v SAT dokonce 5,4 krát vyšší expresi u mužů a 4,8 krát vyšší u žen. Exprese navíc silně korelovala s BMI a poměrem obvodu pasu a boků, ale zatímco v SAT se jednalo o inverzní korelaci, ve VAT byla korelace pozitivní. U myší je exprese naopak vyšší ve VAT oproti SAT (Gesta *et al.* 2006; Liu *et al.* 2014). mRNA exprese u pacientů s nadváhou nebo obezitou jsou v SAT významně sniženy oproti zdravým štíhlým jedincům, a to bez ohledu na pohlaví, zatímco ve VAT jsou mRNA exprese u obézních naopak zvýšené oproti štíhlým jedincům (Ussar *et al.* 2012). Podání roziglitazonu, agonisty PPAR γ , vedlo u myší krmených vysokotukovou dietou k významnému nárůstu exprese Gpc4 v SAT, ale ne ve VAT (Liu *et al.* 2014). Rozdíly v chování Gpc4 v SAT a VAT by tedy mohly přímo souviset s aktivací PPAR γ .

Sérové hladiny Gpc4 korelují s BMI, množstvím tuku v organismu, systolickým tlakem, hladinami alaninaminotransferázy, aspartátaminotransferázy a inzulinu na lačno, s HOMA-IR indexem a s inzulinovou rezistencí (Juan Zhu *et al.* 2014; Ussar *et al.* 2012). Ovšem ve studii Lee *et al.* (Lee *et al.* 2016) byla popsána u DM2 pacientů pozitivní korelace s hladinami aktivního GLP-1 (glukagonu podobný peptid 1), ale ne s HOMA-IR indexem a BMI. Zvýšené hladiny Gpc4 byly zjištěny u pacientů s renální insuficiencí (Cha *et al.* 2016). Pacientky se syndromem polycystických ovárií, který je mimo jiné spojován s DM2, mají zvýšenou sérovou hladinu Gpc4, jež navíc koreluje s prediktory kardiovaskulárního rizika, především s distribucí tukové tkáně (Jedrzejuk *et al.* 2016). Významně vyšší hladiny jsou u mužů než u žen (Juan Zhu *et al.* 2014; Yoo *et al.* 2013). U obézních pacientů jsou hladiny Gpc4 oproti štíhlým jedincům zvýšené, ale pouze pokud mají hyperinzulinémii, porušenou glukózovou toleranci nebo DM2. Sérové hladiny jsou tedy ovlivněny inzulinovou rezistencí (Juan Zhu *et al.* 2014), což odpovídá skutečnosti, že viscerální tuková tkáň přispívá ke vzniku inzulinové rezistence výrazně více, než subkutánní tuková tkáň. Je tedy pravděpodobné, že pacienti s inzulinovou rezistencí budou mít zároveň zvýšené množství viscerální tukové tkáně a z ní uvolňovaného Gpc4. Navíc Gpc4 je pravděpodobně exprimován i jinými tkáněmi, které mohou významně přispívat k jeho sérové hladině.

Z dostupných informací zatím není jasné, zda se Gpc4 podílí na vzniku inzulinové rezistence při obezitě nebo zda se naopak jedná o regulační mechanismus, jehož úlohou je do určité míry inzulinovou rezistencí potlačovat. Vzhledem k tomu, že jeho sérové hladiny s inzulinovou rezistencí silně korelují, mohl by teoreticky sloužit jako její marker.

3.2.4. Chemerin

Chemerin, někdy také označovaný jako TIG2 (tazarotene-induced gene-2) nebo RARRES2 (retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 2), byl objeven v roce 2003 jako přirozený ligand pro receptor ChemR23 (Chemerin Receptor 23) (Meder *et al.* 2003) - receptor typický pro monocyty a makrofágy. Následně byla popsána jeho role chemoatraktantu pro nezralé dendritické buňky s potenciální funkcí regulátoru imunitní odpovědi, zánětu a vývoje kostí (Kutzleb *et al.* 2005). Později byla popsána také jeho role v diferenciaci adipocytů, stimulaci lipolýzy (Ouwens *et al.* 2012) a angiogeneze (Bozaoglu *et al.* 2010). U myši pak bylo zjištěno, že funguje i jako periferní vasokonstriktor, a to přes receptor ChemR23 na hladké svaloviny endotelu (Watts *et al.* 2013).

Chemerin je exprimován tukovou tkání. U pacientů s DM2 a počínajícím metabolickým syndromem je exprese v SAT zvýšena (Chakaroun *et al.* 2012; Jialal *et al.* 2013) a zároveň roste množství chemerinu uvolněného ze SAT do cirkulace (Bremer, Jialal 2013). mRNA exprese v epikardiální tukové tkáni je vyšší u pacientů s ischemickou chorobou srdeční (Gao *et al.* 2011). Zatímco ve studii Tana *et al.* (Tan *et al.* 2009) nezjistili u žen se syndromem polycystických ovárií rozdíly v mRNA expresi v SAT a VAT oproti zdravým štíhlým kontrolním subjektům, ve studii Alfadda *et al.* (Alfadda *et al.* 2012) byly nalezeny významně vyšší exprese v SAT než VAT u pacientů s různým stupněm obezity. Exprese byla navíc významně vyšší u žen než u mužů. Tento rozdíl by teoreticky mohl být vysvětlen různými váhovými kategoriemi pacientů zařazených do těchto studií. Exprese chemerinu v SAT u obézních pacientů navíc negativně korelovala se sérovou koncentrací, což by ukazovalo na negativní zpětnou vazbu v produkci chemerinu v subkutánním tuku, která je potencionována právě obezitou. Ovšem je potřeba dalších výzkumů, které by tuto skutečnost ověřily.

mRNA exprese chemerinu v cirkulujících monocitech je významně zvýšená u obézních pacientů nezávisle na hladině glykémie či přítomnosti diabetu a pozitivně koreluje s jeho plazmatickou hladinou (Catalan *et al.* 2015). To ukazuje na možnou úlohu chemerinu při vzniku subklinického zánětu charakteristického pro obezitu. Exprese chemerinu je také v adipocytech zřejmě zvýšena prozánětlivými podněty (Herova *et al.* 2014). U zdravých štíhlých jedinců a obézních pacientů ale nebyla nalezena korelace s C-reaktivním proteinem, významným indikátorem zánětu, což roli chemerinu v regulaci zánětu částečně vyvrací (Alfadda *et al.* 2012; Chu *et al.* 2012).

Sérové koncentrace chemerinu pozitivně korelují s BMI a věkem, zatímco informace o asociaci s některými dalšími parametry jako je HDL cholesterol, inzulín nebo HOMA-IR index se značně rozcházejí (Alfadda *et al.* 2012; Bozaoglu *et al.* 2009; Coimbra *et al.* 2014; Chu *et al.* 2012). Signifikantně jsou zvýšeny u obézních pacientů bez DM2 oproti zdravým štíhlým jedincům (Bozaoglu *et al.* 2009). U starších pacientů s DM2 je sérová koncentrace chemerinu zvýšena bez ohledu na délku trvání choroby a hodnoty BMI (Coimbra *et al.* 2014). Při hyperinzulinémii stoupá sérová koncentrace chemerinu, k čemuž přispívá i jeho zvýšená produkce adipocyty (Tan *et al.* 2009). U štíhlých normoglykemických jedinců koreluje sérový chemerin s inzulinovou senzitivitou, a to i po adjustaci na BMI a hladinu inzulinu na lačno (Ouwens *et al.* 2012). Vyšší hladiny byly zjištěny u nově diagnostikovaných DM2 pacientů (Fatima *et al.* 2015). Na druhou stranu se proti chemerinu jakožto markeru porušeného

glukózového metabolismu staví studie Bobberta et al. (Bobbert *et al.* 2015), podle které je chemerin jen velmi slabým prediktorem DM2.

Expres chemerinu v SAT byla zkoumána i u pacientů s chronickým onemocněním ledvin, kteří mají zvýšené sérové koncentrace chemerinu. mRNA exprese v SAT se u těchto pacientů nelišila oproti zdravým štíhlým jedincům (Blaszak *et al.* 2015). Zdrojem sérového chemerinu u těchto pacientů jsou zřejmě samotné ledviny. Zdá se tedy, že k systémovým hladinám chemerinu mohou potenciálně významně přispívat i jiné orgány než tuková tkáň, které nemusí být nutně ovlivněny inzulinovou rezistencí. To snižuje relevanci chemerinu jako markeru inzulinové rezistence.

3.2.5. Leptin

Leptin je protein o molekulové hmotnosti 16 kDa skládající se ze 167 aminokyselin. U lidí je kódován tzv. *ob* genem, který se nachází na 7. chromozomu (7q31). Byl objeven v roce 1994, jako první hormon produkovaný tukovou tkání (Zhang *et al.* 1994). Zhang et al. (Zhang *et al.* 1994) zjistili, že příčinou vzniku extrémní obezity u *ob/ob* myši byla právě mutace *ob* genu. Leptin byl pak po určitou dobu považován za hlavní faktor působící v mozku pro snížení příjmu potravy, a tím ve výsledku i pro pokles tělesné hmotnosti (Ahima *et al.* 1996; Zhang *et al.* 1994). Tato teorie byla ovšem postupně vyvrácena.

Běžná obezita je u většiny jedinců doprovázena naopak zvýšenými hladinami leptinu a tzv. leptinovou rezistencí, tedy sníženou reakcí organismu na jeho účinky. Podávání leptinu navíc u obézních lidí nevede k poklesu tělesné hmotnosti (Flier 2004; Heymsfield *et al.* 1999). Hladiny leptinu rychle klesají při snížení kalorického příjmu a tělesné hmotnosti, což je doprovázeno zvýšenou chutí k jídlu a poklesem energetického výdeje (Lord *et al.* 1998). Podobné projevy můžeme pozorovat u leptin-deficientních myši i lidí. Jedinci s úplnou deficiencí leptinu se vyznačují výrazně zvýšenou hmotností. Podávání exogenního leptinu je u nich účinnou terapií (Bjorbaek, Kahn 2004; Flier 2004). V současnosti je leptin považován za hormon signalizující energetický stav organismu, především přechodu mezi hladověním a sytostí (Ahima *et al.* 1996; Flier 1998). Jeho hladiny také stoupají při zánětu (Lord *et al.* 1998).

Leptin je produkován především tukovou tkání, v menší míře také placentou, žaludeční sliznicí, hypofýzou a hypothalamem (Bado *et al.* 1998; Masuzaki *et al.* 1997; Morash *et al.* 1999). V tukové tkáni jsou jeho zdrojem téměř výhradně adipocyty, které produkují leptin

v závislosti na množství tukové tkáně a na energetickém stavu organismu. Produkce je vyšší v subkutánní než ve viscerální tukové tkáni (Fain *et al.* 2004; Wajchenberg *et al.* 2002).

Leptin cirkuluje v krvi převážně vázaný na vazebné proteiny. U obézních lidí stoupá procento volného leptinu, což může měnit především rychlost jeho odbourávání (Houseknecht *et al.* 1996; Sinha *et al.* 1996). Malá část leptinu je v krvi vázána s clusterinem (Arnold *et al.* 2011), který teoreticky může fungovat jako regulátor jeho aktivity (Bajari *et al.* 2003).

Receptor pro leptin je v organismu velmi široce zastoupen. Jedná se o transmembránový receptor strukturálně velmi podobný cytokinovým receptorům I. třídy (Tartaglia *et al.* 1995). V organismu se vyskytuje celkem v šesti izoformách označovaných jako OB-Ra, OB-Rb, OB-Rc, OB-Rd, OB-Re a OB-Rf. Všechny mají extracelulární doménu o délce okolo 800 aminokyselin, transmembránovou doménu skládající se z 34 aminokyselin a intracelulární doménu o variabilní délce. Největší význam má tzv. dlouhá forma (Tartaglia *et al.* 1995). Solubilní forma receptoru, označovaná jako OB-Re nebo také sOB-R se od ostatních forem odlišuje chybící intracelulární doménou (Lee *et al.* 1996). sOB-R je hlavním proteinem vázajícím leptin v lidské krvi (Lammert *et al.* 2001). Jeho množství je závislé na pohlaví, množství tukové tkáně, hladině leptinu a některých hormonů (Chan *et al.* 2002).

Leptin má v organismu celou řadu funkcí. Podílí se na regulaci produkce thyroidálních (Flier *et al.* 2000) a gonadotropních hormonů (Hileman *et al.* 2000), hraje roli v regulaci krevního tlaku, angiogeneze, imunitních a kosterních buněk a adipocytů (Bjorbaek, Kahn 2004; Kershaw, Flier 2004; Lord *et al.* 1998). Má také dvojí termogenní efekt. Aktivuje termogenní procesy v hnědé tukové tkáni a zároveň působí zvýšení tělesné teploty pomocí zatím neznámého, na hnědé tukové tkáni nezávislého, mechanismu (Fischer *et al.* 2016). Přes aktivaci sympatického nervového systému snižuje tvorbu kostní tkáně (Cock, Auwerx 2003). Leptin se významně podílí na regulaci energetické homeostázy, a to přes hypothalamické dráhy nebo přímo ovlivněním periferních tkání (Friedman, Halaas 1998). Stimuluje periferní oxidaci lipidů a zvyšuje mitochondriální respiraci pravděpodobně inhibicí uvolňování oxidu dusnatého (Finocchietto *et al.* 2011; Holmstrom *et al.* 2013). V kosterním svalu ovlivňuje signální dráhu metabolismu mastných kyselin, a tím se přímo podílí na regulaci glukózového metabolismu a vzniku inzulínové senzitivity (Bjorbaek, Kahn 2004).

3.2.6. Prozánětlivé faktory produkované tukovou tkání

Produkce prozánětlivých molekul v tukové tkáni například při obezitě je jednou z hlavních příčin vzniku mírného chronického zánětu v tukové tkáni, který dále přispívá ke

vzniku inzulínové rezistence a metabolického syndromu. Tuková tkáň produkuje celou řadu zánětlivých molekul – cytokinů (např. TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8) a proteinů akutní fáze (např. PAI-1, haptoglobin, sérový amyloid A, C-reaktivní protein) (Bullo *et al.* 2003; Kern *et al.* 2001; Shimomura *et al.* 1996; Xu *et al.* 2003).

Tumor nekrotizující faktor α

Tumor nekrotizující faktor α (TNF- α) je cytokin mající kromě funkce mediátoru akutní zánětlivé odpovědi podíl i na regulaci metabolismu lipidů a funkce adipocytů. Jedná se například o stimulaci lipolýzy díky zvýšení exprese hormon-senzitivní lipázy a inhibici lipoproteinové lipázy. Má také přímý vliv na indukci diferenciaci adipocytů, jejich apoptózu a indukci inzulínové rezistence (Feinstein *et al.* 1993; Hotamisligil *et al.* 1993; Sewter *et al.* 1999). Díky serinové fosforylaci IRS inhibuje inzulínovou signální kaskádu (Aguirre *et al.* 2000). Zvyšuje expresi prozánětlivých cytokinů, chemokinů a superoxidových aniontů a také napomáhá ke zvýšení endoteliální permeability a adheze pro zánětlivé buňky, což společně vede ke vzniku akutního zánětu (Pryhuber *et al.* 2000). TNF- α reguluje množství tukových buněk skrze regulaci diferenciaci preadipocytů na zralé adipocyty (Coppack 2001). Zvyšuje mRNA expresi leptinu a IL-6 v tukové tkáni. Snižuje inzulínem-stimulovaný příjem glukózy ovlivněním GLUT4, snížením autofosforylace inzulínového receptoru a zvýšením fosforylace IRS1, což má celkově za následek vznik inzulínové rezistence (Coppack 2001).

V tukové tkáni se na expresi TNF- α podílejí adipocyty pouze minimálně, méně než z 10 % (Fain *et al.* 2004). Primárně je zde produkován stromavaskulární frakcí, především monocyty a makrofágy, v menší míře i lymfatickými buňkami, fibroblasty, neuronálními a endoteliálními buňkami (Sewter *et al.* 1999; Wajant *et al.* 2003). Hlavním stimulem jeho produkce je lipopolysacharid (Sewter *et al.* 1999). TNF- α není na rozdíl od dalších zánětlivých faktorů z tukové tkáně uvolňován do cirkulace (Mohamed-Ali *et al.* 1997b). Jeho produkce roste s velikostí adipocytu, což vede k iniciaci změn zodpovědných za snížení velikosti adipocytu nebo dokonce spuštění apoptózy (Coppack 2001).

V organismu je známo více než 20 receptorů vázajících TNF- α , v tukové tkáni se uplatňují především 2 formy. Primárně je to ve většině tkání exprimovaný receptor pro tumor nekrotizující faktor 1 (TNF-R1, označován také jako gp60 nebo TNFR60), který přes transkripční faktor NF- κ B a proteinové kinázy JNK zprostředkovává apoptózu a je také zásadní pro stimulaci lipolýzy. Exprese TNF-R2 (gp80, TNFR80) je striktně specifická po imunitní buňky – přes MAPK dráhy řídí jejich pohyb a diferenciaci (Coppack 2001; Wajant *et al.*

2003). Sérová koncentrace i exprese receptorů pro TNF- α je v tuku vyšší u obézních než u štíhlých jedinců (Hube *et al.* 1999; Moon *et al.* 2004). Přitom exprese TNF-R1 pozitivně koreluje s BMI a velikostí tukových buněk, zatímco TNF-R2 a TNF- α mRNA pozitivně koreluje se sérovou hladinou inzulínu a triglyceridů (Hube *et al.* 1999). Ovšem tyto výsledky nejsou v literatuře konzistentní – např. Sewter *et al.* (Sewter *et al.* 1999) ve své studii z roku 1999 nezjistili žádnou korelaci mezi uvolňováním TNF- α a BMI, ani žádný vliv inzulínu.

Interleukin-6

Interleukin-6 (IL-6) je cytokin podílející se na pro i protizánětlivých dějích v organismu. Má vliv na diferenciaci T- a B-lymfocytů nebo uvolňování proteinů akutní fáze z hepatocytů, na druhé straně snižuje expresi některých prozánětlivých cytokinů (Jones *et al.* 2001; Xing *et al.* 1998). Jeho sérové hladiny korelují s hladinami C-reaktivního proteinu, jednoho z proteinů akutní zánětlivé fáze (Coppack 2001). Podílí se na buněčných signálních drahách, které vedou k procesům proliferace, diferenciace, ale i apoptózy. Je produkován většinou buněk těla – např. endoteliálními, svalovými, většinou imunitních buněk, adipocyty, beta-buňkami pankreatu, hepatocyty, mikrogliálními buňkami, astrocyty a fibroblasty (Fried *et al.* 1998; Kristiansen, Mandrup-Poulsen 2005).

IL-6 působí v mozku v centrech řízení energetické regulace a výdeje. Pokles jeho tvorby v centrálním nervovém systému tak může být potenciálně jedním z mechanismů vedoucích k rozvoji obezity a inzulínové rezistence (Kristiansen, Mandrup-Poulsen 2005). Receptor pro IL-6 na hypotalamu je homologní s receptorem pro leptin. Teoretická schopnost IL-6 ovlivňovat uvolňování leptinu by mohla mít za následek ovlivnění energetické rovnováhy změnou příjmu potravy, fyzické aktivity a termogeneze. Podání IL-6 vede k potlačení chuti k jídlu, a proto je zároveň zkoumán i v souvislosti s anorexií (Coppack 2001). IL-6 také hraje roli v regulaci visfatinu – adipokinu regulujícího glukózovou toleranci (Mohamed-Ali *et al.* 1997b). Podobně jako TNF- α a leptin, snižuje i IL-6 aktivitu lipoproteinové lipázy, a navíc stimuluje hormon senzitivní lipázu v tukové tkáni, což může mít za následek lokální regulaci metabolismu (Coppack 2001; Fried *et al.* 1998).

Receptor pro IL-6 se skládá z α a β glykoproteinových podjednotek. Podjednotka IL-6R α (CD126) se vyskytuje v solubilní i membránově vázané formě. Nemá signální úlohu a je exprimována pouze na hepatocytech, leukocytech a adrenokortikoidních buňkách hypofýzy. Podjednotka IL-6R β (CD130) je exprimována všemi buněčnými typy a je striktně membránově vázaná. Po vazbě ligandu aktivuje IL-6R β Janusovu kinázu, která se fosforyluje

a následně aktivuje STAT3 transkripční dráhu a zároveň přes SH2 (Src homology 2 domain) aktivuje transkripční dráhu MAPK (German *et al.* 2011; Heinrich *et al.* 2003; Jones *et al.* 2001; Kristiansen, Mandrup-Poulsen 2005). Výsledkem mohou být tak rozdílné děje jako aktivace diferenciaci a proliferaci T- a B-buněk, stimulace produkce adrenokortikotropního hormonu nebo vznik horečky (Heinrich *et al.* 1998).

Tuková tkáň produkuje 15-35 % systémového IL-6, a to s cirkadiálním rytmem kulminujícím ve večerních hodinách (Mohamed-Ali *et al.* 1997b). Produkce IL-6 jednotlivými typy tukové tkáně se významně liší, a to i mezi jednotlivými studiemi. Například subkutánní tuková tkáň exprimuje třikrát méně IL-6 než omentální tuková tkáň (Fried *et al.* 1998). U pacientů s kardiovaskulárními chorobami byla zjištěna exprese IL-6 epikardiální tukovou tkání téměř 30 krát nižší než omentální a 10 krát nižší než abdominální tukovou tkání (Baker *et al.* 2006). Ovšem podle další studie u podobné kohorty pacientů byla exprese v epikardiálním tuku vyšší než v subkutánním (Mazurek *et al.* 2003). Samotné adipocyty přitom produkují jen malou část z celkového IL-6. V subkutánní i viscerální tukové tkáni jen 4-10 % (Fain *et al.* 2004; Fried *et al.* 1998).

Monocyty přitahující protein 1

Monocyty přitahující protein 1 (MCP-1), je cytokin patřící do C-C rodiny chemokinů. Proto je také označován jako chemokin (C-C motif) ligand 2 (CCL2). Jedná se o hlavní faktor zodpovědný za chemotaxi monocytů, T-buněk (Carr *et al.* 1994) a bazofilů (Bischoff *et al.* 1992) do místa poškození tkáně nebo infekce. MCP-1 působí na leukocyty pomocí dvou typů membránových receptorů spojených s G-proteiny specifickými pro monocyty, bazofily a T-lymfocyty – převládajícím CCR2 (chemokin (C-C motif) receptor 2) a minoritně zastoupeným CCR4 (Baggiolini 1998).

Expres MCP-1 je významně snížena působením protizánětlivých faktorů – především IL-10, adiponektinu a kortikosteroidů (Bruun *et al.* 2005; Sell *et al.* 2006). Prozánětlivé cytokiny a chemokiny (IL-1 β , -4, -8, TNF- α a další) jeho sekreci zvyšují. IL-6 zvyšuje produkci MCP-1 pouze při vysoké hladině svého solubilního receptoru IL-6R α (Bruun *et al.* 2005).

Při obezitě dochází k významnému nárůstu exprese MCP-1 tukovou tkání, která vede ke vstupu monocytů do tkáně a k jejich postupné přeměně na makrofágy (Cancello *et al.* 2005). MCP-1 se přímo podílí na přestavbě a expanzi tukové tkáně svým angiogenním efektem (Sell *et al.* 2006). Za produkci MCP-1 je v tukové tkáni zodpovědná především neadipocytární složka (Bruun *et al.* 2005; Dahlman *et al.* 2005). U obézních myši je podíl exprese

z tukové tkáně na plazmatické hladiny 10-100krát vyšší než z jater, ledvin a plic. To by znamenalo, že tuková tkáň je u obézních jedinců hlavním zdrojem MCP-1 (Sartipy, Loskutoff 2003). Plazmatická hladina i mRNA exprese MCP-1 v tukové tkáni je zvýšena jak u myši obézních díky vysokotuké dietě, tak u geneticky obézních diabetických myši (*db/db*) (Kanda *et al.* 2006). Nicméně u obézních lidí sice dochází ke zvýšení exprese MCP-1 v tukové tkáni, ale nezvyšují se jeho plazmatické hladiny (Dahlman *et al.* 2005). To by naznačovalo, že u lidí na rozdíl od pokusných zvířat působí MCP-1 secernovaný tukovou tkání pouze jako lokální faktor. Ovšem pro zjištění skutečného stavu jsou zapotřebí ještě další studie.

Faktor ovlivňující migraci makrofágů

Faktor ovlivňující migraci makrofágů (MIF, macrophage migration inhibitory factor) je cytokin secernovaný při poranění, sepsi nebo jiných zánětlivých stavech organismu. Produkován je hypofýzou, dále makrofágy a T-lymfocyty, v menší míře většinou buněčných typů včetně adipocytů (Bucala 1996; Corallo *et al.* 2015; Skurk *et al.* 2005).

Za fyziologických podmínek cirkuluje MIF v krvi v příliš nízké koncentraci na to, aby došlo ke spuštění zánětlivých drah. Při stresu nebo systémovém zánětu je aktivována jeho produkce především bazofily z hypofýzy (Bucala 1996). Bazofily zároveň produkují adrenokortikotropní hormon, který stimuluje adrenální produkci protizánětlivě působících glukokortikoidů. Produkce MIF je hladinou glukokortikoidů přímo regulována, a to ze všech jej produkujících buněčných typů (Bucala 1996). Nízká hladina glukokortikoidů vyvolává expresi MIF makrofágy, což zcela potlačuje protizánětlivý vliv glukokortikoidů. Při vysoké koncentraci glukokortikoidů je sekrece MIF naopak zastavena (Calandra *et al.* 1995).

Sekretovaný MIF se váže na receptor CD74 (Leng *et al.* 2003; Shan *et al.* 2009) na antigen prezentujících buňkách, což vede ke stimulaci prozánětlivých faktorů (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , -6 a -8 a další), (Larson, Horak 2006). Pro aktivaci buněčné odpovědi je však kromě vazby na receptor CD74 nutná koaktivace receptorů CD44 nebo CXCR4 (Shi *et al.* 2006b; Schwartz *et al.* 2009). To následně vyvolá aktivaci intracelulárních signálních drah řídících buněčnou proliferaci a přežívání – dráhy PI3K/Akt (Lue *et al.* 2007), ERK-1/2 MAP kináza (Lue *et al.* 2006) a NF- κ B (Starlets *et al.* 2006). Přes CXC chemokinové receptory (CXCR) receptory -2 a -4 pak ovlivňuje migraci zánětlivých buněk (Bernhagen *et al.* 2007).

Produkce MIF makrofágy je ovlivněna vzájemnou pozitivní zpětnou vazbou s TNF- α , což vede k aktivaci kritické zánětlivé odpovědi organismu (Calandra *et al.* 1994). MIF chrání makrofágy před apoptózou inhibicí transkripčního faktoru p53, čímž prodlužuje jejich

životnost, a tím v konečném důsledku i dobu trvání zánětlivého procesu (Mitchell *et al.* 2002; Skurk *et al.* 2005). MIF je zásadní pro vznik sepse – bez něj nedochází u myši k reakci makrofágů na endotoxin a vzniku septického šoku (Calandra *et al.* 2000) a to vzhledem ke snížení exprese TLR4, tedy receptoru pro lipopolysacharid (Roger *et al.* 2001).

Plazmatická hladina MIF u lidí pozitivně koreluje s BMI (Dandona *et al.* 2004; Ghanim *et al.* 2004) a u pacientek se syndromem polycystických ovárií byla zjištěna i pozitivní korelace s procentem celkového a trunkálního tuku (Gonzalez *et al.* 2010). U pacientů s metabolickým syndromem, inzulínovou rezistencí a diabetes mellitus 2. typu byly zjištěny zvýšené hladiny oproti zdravým kontrolním subjektů (Herder *et al.* 2006; Kim *et al.* 2011b; Yabunaka *et al.* 2000).

Preadipocyty spontánně produkují MIF, a to v rostoucí míře při diferenciaci na zralé adipocyty. Produkce zdravými adipocyty koreluje s BMI jedince a neliší se mezi subkutánním a omentálním tukem (Skurk *et al.* 2005). mRNA exprese v subkutánním i viscerálním tuku je zvýšena u obézních jedinců, koreluje s obvodem pasu a ve viscerálním tuku je přibližně dvakrát vyšší (Alvehus *et al.* 2010; Gonzalez-Muniesa *et al.* 2013). Zatím ale nejsou dostupné studie, které by zodpověděly otázku, zda je MIF z tukové tkáně uvolňován do cirkulace. Skutečnost, že jeho mRNA exprese v subkutánní tukové tkáni nekoreluje s plazmatickou hladinou, spíše hovoří proti této tezi (Tam *et al.* 2012).

3.2.7. Faktory produkované tukovou tkání podílející se na adaptaci na oxidační stres a přežívání buněk

B-cell lymphoma 2

B-cell lymphoma 2 (BCL-2) získal svůj název díky objevu v souvislosti s lidským folikulárním lymfomem (Hockenbery *et al.* 1991; Zamzami *et al.* 1998). Patří do skupiny proteinů regulujících propustnost vnější mitochondriální membrány, a tím i apoptózu. Samotný Bcl-2 a další jemu blízké příbuzné proteiny jako jsou Bcl-xl, Bcl-w, Mcl-1 a A1/B-1, působí antiapopticky. Jejich nedostatečná exprese vede k degeneraci tkání (Hinds *et al.* 2003). BCL-2 reguluje aktivaci mitochondriálního membránového kanálu MAC, který umožňuje průchod intramembránovým proteinům jako je cytochrom c z buňky do cytosolu, čímž zahajuje kaskádu vedoucí k apoptóze (Kinnally, Antonsson 2007). Exprese BCL-2 tedy funguje jako prevence proti všem změnám v buňce, které by potenciálně mohly zahájit apoptózu. Jedná se např. o změny mitochondrií, aktivace kaspáz a nukleáz, redistribuce iontů a oxidační změny v buněčném redox potenciálu (Zamzami *et al.* 1998). BCL-2 také zlepšuje přežití buňky

v podmínkách hladovění a stimuluje ochranu antioxidanty. Blokuje produkci kyslíkových radikálů, které hrají roli v apoptických a nekrotických procesech (Longo *et al.* 1997).

BCL-2 je normálně exprimován ve zralých T- a B-lymfocytech, ale i v dalších dlouho žijících buňkách jako jsou neurony, kmenové buňky ve střevě a kůži, nezralé prekurzory erytrocytů, myelocyty, trombocyty a adipocyty (Gullicksen *et al.* 2003; Hockenbery *et al.* 1991).

U myši s mutací BCL-2 dochází k poklesu tělesné hmotnosti a délky života (Nakayama *et al.* 1994). BCL-2 v souvislosti přímo s tukovou tkání nebyl příliš zkoumán. Množství proteinu a mRNA exprese BCL-2 v subkutánní a viscerální tukové tkáni je významně sníženo u obézních pacientů oproti zdravým štíhlým subjektům. Vlivem IL-6 a TNF- α je mRNA exprese BCL-2 *in vitro* v tukové tkáni snížena (Tinahones *et al.* 2013). Zajímavé výsledky přinesla studie Gullicksen *et al.* (Gullicksen *et al.* 2003) věnující se vlivu podávání leptinu na množství cytosolického BCL-2 v tukové tkáni. Autoři zjistili, že zároveň dochází k ovlivnění exprese proapoptického proteinu Bax, který je BCL-2 blízce příbuzný, ale má opačný účinek. Vliv leptinu na různá tuková depa (retroperitoneální, epikardiální a z oblasti třísel) se přitom liší. Zatímco poměr mitochondriální BCL-2/Bax vzrostl ve všech zkoumaných typech tukové tkáně, exprese BCL-2 nejvíce stoupla po čtyřdenním podávání leptinu v epikardiálním tuku, to také bylo spojeno s nejmenším poklesem váhy. Naopak v tuku z oblasti třísel došlo jen k malému vzrůstu hladin BCL-2 a k velkému nárůstu Bax, což mělo za následek větší úbytek tukové hmoty. 21 dnů po podání leptinu pak hladina BCL-2 ve všech sledovaných tukových depech ještě vzrostla. To by mohlo být vysvětleno jako kompenzace ztráty buněk při obnově tkáně (Gullicksen *et al.* 2003).

Glutathion peroxidáza 1

Glutathion peroxidáza 1 (GPX1) je klíčový antioxidační enzym většiny buněk. Byla objevena na základě své schopnosti chránit červené krvinky proti hemolýze způsobené kyslíkovými radikály (Mills 1957). Principem její funkce je katalýza oxidace redukovaného glutathionu pomocí hydrogen peroxidu. Díky tomu dokáže metabolizovat hydrogen peroxidy na vodu a lipidové peroxidy na příslušné alkoholy, a tím inhibovat jimi indukovanou apoptózu (Blankenberg *et al.* 2003). Při její zvýšené aktivitě může dojít k inhibici buněčných dějů, které jsou závislé na zásobách redukovaného glutathionu, např. stabilizaci buněčné membrány (Arthur 2000). Studie na buněčných liniích ukázaly, že GPX1 chrání buňky před působením volných kyslíkových radikálů (Kelner *et al.* 1995; Taylor *et al.* 1993). Podávání mastných

kyselin přímo zvyšuje expresi GPX1. To mimo jiné vysvětluje antioxidační účinky rybího tuku bohatého na mastné kyseliny (Camargo *et al.* 2014; Crosby *et al.* 1996).

Při hypertermii dochází v tkáních k oxidačnímu stresu díky zvýšení produkce reaktivních kyslíkových radikálů. Myši se zvýšenou produkcí GPX1 mají při vystavení zvýšeným teplotám významně sníženou schopnost produkce peroxidáz a díky tomu i cytoprotektivního heat shock proteinu 70. Tato zvířata jsou tak výrazně náchylnější k poškození mozku při přehřátí organismu (Mirochnitchenko *et al.* 1995).

Transkripční faktor NF- κ B je aktivován stresem a podílí se na řízení exprese některých adipokinů, a tím přispívá k rozvoji inzulinové rezistence. GPX1 díky snížení c-Src kinázové aktivity snižuje aktivitu NF- κ B *in vitro* (Fan *et al.* 2003). Mírný subklinický zánět typický pro obezitu vede ke zvýšenému oxidačnímu stresu a produkci reaktivních aldehydů. Zvýšená hladina aldehydů způsobuje alkylaci aktivního selenocysteinového místa GPX1 a její deaktivaci. Inaktivace GPX1 vede k hromadění glutathionu a zastavení inhibice aktivity NF- κ B v adipocytech, což následně vyvolává stresovou odpověď a dále přispívá ke vzniku zánětu u obézních jedinců (Grimsrud *et al.* 2007; Kobayashi *et al.* 2009).

Vystavení adipocytů střednědobé hypoxii (1% O₂ po 24 hod) vede ke snížení mRNA exprese GPX1 (Wang *et al.* 2008b).

Metallothionein 3

Metallothioneiny jsou intracelulární proteiny vázající kovy. Jsou typické nízkou molekulární hmotností a vysokým obsahem cysteinu. Jejich transkripce je aktivována buď přítomností zinku, vnějším stresem nebo změnou redoxního potenciálu (Coyle *et al.* 2002; Murphy *et al.* 2008). Metallothionein 3 (MT3) se od ostatních členů této proteinové rodiny liší skutečností, že *in vivo* není jeho exprese zvýšena působením zinku, kadmia, dexamethazonu ani bakteriálního endotoxinu (Palmiter *et al.* 1992). MT3 váže volné kyslíkové radikály a podílí se na ochraně buněk před některými toxickými látkami (Moffatt, Denizeau 1997).

MT3 hraje významnou neuroprotektivní roli v mozku jako ochrana před cytotoxickým efektem ROS (You *et al.* 2002). I když byl původně považován za specifický pouze pro mozek (Palmiter *et al.* 1992), byla jeho mRNA exprese zjištěna i v dalších tkáních - srdci, žaludku, ledvinách, reprodukčních orgánech a také v bílé tukové tkáni (Coyle *et al.* 2002; Wang *et al.* 2008b). Zde se kromě své role antioxidantu podílí i na buněčné proliferaci, neoplazii a apoptóze (Murphy *et al.* 2008).

U potkanů není exprese MT3 v tukové tkáni nijak ovlivněna nutričním stavem (Szrok *et al.* 2016). MT3-knockout myši více přibývají na váze než normální jedinci, pravděpodobně díky zpomalení metabolismu (Byun *et al.* 2011). U lidí je MT3 více exprimován v omentální než subkutánní tukové tkáni (Wang *et al.* 2008b).

Podle studie Wanga *et al.* (Wang *et al.* 2008b) je mRNA exprese MT3 v lidských adipocytech vystavených hypoxii (1 % O₂) výrazně zvýšena a to již po 45-60 minutách. Obdobná reakce nastala i po navození tzv. chemické hypoxie u adipocytů (podání směsi CoCl₂, desferrioxaminu, dimetyloxalylglycinu), která stejně jako běžná hypoxie také působí přes HIF-1 α (α podjednotka hypoxií-indukovaného faktoru 1). Aktivace transkripce MT3 tedy bude pravděpodobně řízena přes HIF-1 α a z toho plyne domněnka, že možnou úlohou MT3 v tukové tkáni je ochrana před následky hypoxie (Wang *et al.* 2008b).

4. Hypoxie

Hypoxie je definována jako snížení koncentrace kyslíku v celém organismu nebo jednotlivých tkáních. Vzniká buď snížením přísunu kyslíku do organismu (zastavení dýchání, snížení koncentrace kyslíku ve vdechovaném vzduchu) nebo poškozením transportu kyslíku z plic dále do organismu. Snaha co nejrychleji obnovit normální stav okysličení je doprovázena rychlými změnami v dýchání, kardiovaskulárním systému a hematopoeze (Smith *et al.* 2008).

Buňky reagují na pokles tlaku kyslíku změnami v mRNA expresi široké škály genů podílejících se na metabolických a zánětlivých drahách a v reakci na stres. Jedná se především o hlavní marker hypoxie HIF1- α (Wang *et al.* 2007). Přítomnost HIF1- α přímo nebo zprostředkovaně reguluje genovou transkripci celé řady tzv. HIF (hypoxií-indukovaný faktor) vazebných genů, které kódují proteiny zprostředkovávající adaptivní odpověď organismu na hypoxii. Jedná se o širokou škálu genů, které jsou zahrnuty v různých funkčních drahách řídících např. angiogenezi, apoptózu, buněčný metabolismus nebo regulaci vazomotoriky (Semenza 2000). Mezi HIF vazebné geny jsou řazeny např. gen pro lidský erytropoetin, vaskulární endoteliální růstový faktor, glykolytické enzymy nebo glukózové transportéry GLUT1 a 3 (Semenza 2000; Wang *et al.* 1995). Konkrétně v tukové tkáni byla zjištěna vlivem hypoxie snížená exprese GPX-1 a naopak zvýšená exprese MT3, GLUT1, IL-6, leptinu, TNF- α , MIF nebo VEGF (vaskulární endoteliální růstový faktor) (Wang *et al.* 2007; 2008a; b; Wood *et al.* 2007).

4.1. Geny ovlivněné hypoxií

Hypoxií indukovaný faktor 1

Hypoxií indukovaný faktor (HIF) 1 je heterodimerní helix-loop-helix transkripční faktor skládající se ze dvou podjednotek - α a β . HIF1- α podjednotka je regulována hladinou kyslíku. Za normoxických podmínek je hydroxylována a pomocí von Hippel-Lindau proteinu, součásti E3 ubiquitin ligázového komplexu, je nasměrována do proteazomu a zde degradována (Maxwell 2005; Wang *et al.* 1995; Yu *et al.* 2001). Při poklesu koncentrace kyslíku na úroveň hypoxie dochází v buňce k nárůstu hladin ROS v mitochondriích a HIF1- α již není hydroxylován a může být translokován do jádra, kde dimerizuje s na kyslíku nezávislou podjednotkou HIF1- β , a tím iniciuje genovou transkripci (Chandel *et al.* 2000; Lin *et al.* 2006). HIF1- α se tedy nachází ve všech typech buněk v organismu pouze při hypoxii. Díky tomu je míra jeho exprese teoreticky ideálním molekulárním ukazatelem míry hypoxie ve tkáni.

V tukové tkáni je HIF1- α exprimován především stromavaskulárními buňkami (Wang *et al.* 2007). Nicméně i v adipocytech je hlavním spouštěčem drah reagujících na hypoxii. Při přeměně preadipocytů na zralé adipocyty nedochází k výrazné změně jeho exprese, avšak zvýšená hladina HIF1- α této přeměně brání (Lin *et al.* 2006). U pacientů s morbidní obezitou je zvýšena exprese HIF1- α , která klesá po redukci hmotnosti (Cancello *et al.* 2005). To je možné vysvětlit skutečností, že s rostoucí velikostí adipocytů roste vzdálenost, kterou k nim musí kyslík difundovat skrz tkáň a jeho dostupnost pro buňky tak klesá (Hosogai *et al.* 2007). Při obezitě tedy dochází v tukové tkáni díky hypertrofii adipocytů ke vzniku lehké hypoxie, která přispívá ke vzniku mírného chronického zánětu a v důsledku tak i inzulinové rezistence (Trayhurn, Wood 2004). Ovšem studie zabývající se měřením parciálního tlaku kyslíku v lidské tukové tkáni *in vivo* překvapivě zjistila dokonce zvýšenou hodnotu u obézních pacientů (Goossens *et al.* 2011). Parciální tlak kyslíku ve tkáni vzniká jako výsledek rovnováhy mezi přísunem kyslíku a metabolickým obratem. Proto se nabízí vysvětlení, že při obezitě je spotřeba kyslíku v tukové tkáni snižena a parciální tlak je tak vyšší (Goossens, Blaak 2012).

Glukózový transportér 1

Glukózový transportér 1 je kódován genem SLC2A1. Je tvořen pórem z 12 transmembránových domén, kterým prostupuje glukóza do buňky nezávisle na Na^+ usnadněnou difuzí po svém difuzním gradientu přes plazmatickou membránu. Relativně konstantní tok glukózy do buňky je zajištěn tím, že její hladina negativně koreluje s expresí GLUT1 (Mueckler 1994). Ve fetálním stádiu je GLUT1 převládajícím glukózovým transportérem (Klip *et*

al. 1994). Postnatálně je exprimován především v mozku a červených krvinkách, v menší míře pak ve většině buněčných typů včetně svalů, jater a tukové tkáně (Wood, Trayhurn 2003). Expresi GLUT1 ovlivňuje široká škála faktorů – zvyšují ji např. thyroideální hormony, TNF- α , inzulin a mnoho dalších (Mueckler 1994; Szablewski 2016).

Hlavním glukózovým přenašečem v tukové i svalové tkáni je GLUT4, který je v buňkách lokalizován v intracelulárních vezikulech a teprve v přítomnosti inzulinu je translokován na povrch buňky. Oproti tomu přenos glukózy pomocí GLUT1 není inzulinem ovlivněn (Kahn 1994; Klip *et al.* 1994; Szablewski 2016). Tím, že je GLUT1 neustále přítomen v plazmatické membráně, zajišťuje konstantní přísun nízké hladiny glukózy z krve přes extracelulární tekutinu do cytoplazmy adipocytů, nezbytnou pro základní funkce buňky (Mueckler 1994).

V lidských adipocytech je exprese GLUT1 zvýšena při hypoxii, čímž je zvýšen příjem glukózy tukovou tkání (Wood *et al.* 2007).

Substrát 1 inzulinového receptoru

Substrát 1 inzulinového receptoru (IRS1) má funkci takzvaného docking proteinu mezi inzulinovým receptorem a komplexem intracelulárních signálních molekul s SH2 doménou (Sesti *et al.* 2001). Vazba SH2 domény IRS1 na inzulinový receptor nebo receptor pro inzulinu podobný růstový faktor 1 aktivuje tyrozin-kinázovou aktivitu receptoru a tím fosforylaci IRS1 v tyrozinové oblasti. Fosforylovaný IRS1 aktivuje vazbou fosfatidylinositol-3-kinázu, která začne produkovat fosfatidylinositol trifosfát. Výsledkem je aktivace efektorových kináz na membráně (antiapopticky působící Akt, glykogen syntázová kináza a další) a translokace GLUT4 z cytoplazmy do plazmatické membrány. IRS1 se tak podílí na regulaci intracelulárních drah řídících buněčnou diferenciaci, růst, přežití a metabolismus (Jiang, Zhang 2005; Kang *et al.* 2007; Sesti *et al.* 2001).

IRS1 je přítomen na převážné většině buněčných typů (Lavin *et al.* 2016). Při diferenciaci lidských preadipocytů na zralé adipocyty dochází k desetinásobnému nárůstu exprese IRS1, což spolu s nárůstem exprese GLUT4 umožňuje zvýšení schopnosti buňky provádět inzulinem stimulovaný transport glukózy (Pederson, Rondinone 2000). Exprese IRS1 adipocyty *in vitro* klesá po podání inzulinu díky snížení posttranslačních hladin zkrácením poločasu životnosti proteinu IRS1 (Araki *et al.* 1994). Těžce obézní (Goodyear *et al.* 1995) i pacienti DM2 (Rondinone *et al.* 1997) mají sníženou hladinu IRS1.

Při krátkodobém vystavení buněk hypoxii dochází k potlačení aktivity Akt kinázy. Nedochází tedy k inhibici kaspáz, které degradují IRS1. Při normalizaci koncentrace kyslíku se hladina IRS1 rychle obnovuje. Tak je zajištěn optimální přísun energie do buňky nutné pro metabolismus v závislosti na dostupnosti kyslíku (Kang *et al.* 2007).

5. Hypotermie

Za fyziologických podmínek je teplota tělesného jádra udržována v relativně úzkém rozmezí 36,5-37,5 °C (Brown *et al.* 2012). Pokles tělesné teploty pod tuto hladinu označujeme jako hypotermie. Rozlišujeme tři stupně hypotermie podle míry podchlazení – mírnou (nejčastěji udáváno rozmezí tělesné teploty 35-32 °C), střední (32-28 °C) a hlubokou (< 28 °C).

Hypotermie vzniká při dlouhodobém vystavení organismu teplotě nižší, než je jeho termoneutrální zóna nebo pokud stav organismu neumožňuje dostatečné zapojení termoregulačních mechanismů, například při úplném vyčerpání. Tzv. náhodná hypotermie nastává při delším vystavení velmi nízkým teplotám, například při tonutí ve studené vodě nebo zavalení lavinou. Případně představuje možnou komplikaci operačních zákroků, protože při celkové anestezii dochází kvůli periferní vazodilataci způsobené anestetiky během první hodiny k poklesu tělesné teploty minimálně o 1 °C a tento pokles nadále pokračuje během celé operace (Sessler *et al.* 1991). Oproti tomu uměle navozená kontrolovaná hypotermie může být zároveň použita jako léčebná metoda, která byla poprvé zmíněna již v nejstarším medicínském textu na světě - papyru Edwina Smithe (Coetzee *et al.* 2004). Jejím principem je postupné ochlazování pacienta doprovázené podáváním léků zabraňujících zapojení termoregulačních mechanismů, především svalového třesu. Tím nedochází k vyčerpání adenosintrifosfátu a destabilizaci organismu. Zatímco dříve bylo podchlazení organismu používáno jako forma anestezie, dnes se uměle navozená hypotermie stala běžnou součástí kardiologických operací s dočasnou zástavou krevního oběhu a také některých neurologických operací. Je také používána u pacientů po srdeční zástavě na jednotkách intenzivní péče, u nichž zlepšuje neurologickou prognózu (Solař 2004; Williams, Spencer 1958; Yenari, Hemmen 2010).

Podle van't Hoffova pravidla, označovaného také jako teplotní koeficient Q₁₀, klesá rychlost chemických reakcí dvojnásobně při každém snížení teploty o 10 °C. Zároveň s nižší teplotou dochází k poklesu fluidity lipidických buněčných membrán a poruše regulace iontové rovnováhy, což může vést k vážným strukturálním a funkčním poruchám, končícím až smrtí (Zachariassen 1991). Zároveň klesá i rychlost metabolismu a s tím spojená spotřeba

kyslíku v tkáních. U experimentálních zvířat bylo zjištěno snížení spotřeby kyslíku v mozku o 5 % při snížení tělesné teploty o každý 1 °C v rozmezí 22-37 °C (Hagerdal *et al.* 1975). Na druhou stranu hypotermie zároveň posouvá oxyhemoglobinovou disociační křivku doleva (Garcia, Gantt 1994b) a snižuje krevní cirkulaci zvýšením krevní viskozity (Chen, Chien 1978). Výsledný pokles dostupnosti kyslíku pro tkáň může teoreticky naopak zvýšit riziko vzniku hypoxie v některých tkáních a tím alespoň částečně potlačit pozitivní efekt snížené spotřeby kyslíku.

U pacientů vystavených mírné hypotermii dochází k poklesu počtu periferních lymfocytů a NK buněk (Saito *et al.* 2001). U pokusných zvířat podstupujících kardiopulmonální bypass byla zjištěna nižší mobilizace leukocytů a neutrofilů při jejich vystavení hypotermním podmínkám. Ovšem tento pozitivní efekt platil pouze pro mírnou hypotermii. Při hluboké hypotermii měla zvířata po operaci paradoxně dokonce zvýšené množství leukocytů oproti normotermní skupině (Qing *et al.* 2001). V *in vitro* podmínkách potlačuje hypotermie tvorbu prozánětlivých cytokinů v lidských mononukleárních buňkách z periferní krve (Kimura *et al.* 2002). Při velmi mírné hypotermii dochází k snížení nárůstu IL-1 a -2 oproti normotermní skupině 24 hodin po operaci. Avšak u dalších prozánětlivých cytokinů tento efekt nebyl pozorován (Beilin *et al.* 1998). Celkově se tedy zdá, že hypotermie snižuje zánětlivou odpověď organismu.

Hlavním orgánem zkoumaným v souvislosti s hypotermií je mozek. Prokázaným pozitivním účinkem hypotermie je jeho ochrana před vznikem ischemie díky snížení potřeby kyslíku (Bernard *et al.* 2002). Také tlumí vznik ROS, protože zvyšuje obsah redukováného glutathionu a aktivitu superoxid dismutázy a glutathion peroxidázy (Globus *et al.* 1995; Lei *et al.* 1994). Mírná hypotermie významně zvyšuje srdeční výdej a způsobuje tachykardii zvýšením aktivity sympatiku spolu s nárůstem katecholaminů a kortikoidů (Garcia, Gantt 1994a; Hildebrand *et al.* 2004). Hypotermie inhibuje koagulační kaskádu tím, že vede k poruše funkce krevních destiček, enzymatické funkce srážlivého faktoru i fibrinolytické aktivity. Tím se prodlužuje doba krvácení (Sessler 2001). O vlivu hypotermie na lidskou tukovou tkáň nejsou v literatuře dostupné prakticky žádné relevantní informace.

6. Hypotéza a cíle práce

Hypotéza

Uměle navozená hypotermie vede k potlačení lokální zánětlivé odpovědi a může tak mít protektivní účinek před vznikem hypoxie v tukové tkáni, což vede ke zlepšení lokální zánětlivé reakce v tukové tkáni a potenciálně i prognózy pacienta po kardiologické operaci.

Změny endokrinní funkce tukové tkáně se významně podílejí na metabolických komplikacích obezity. mRNA exprese a sérové koncentrace clusterinu a dalších faktorů produkováných v tukové tkáni se liší u obézních pacientů s a bez diabetes mellitus 2. typu oproti zdravým štíhlým jedincům. Tyto hladiny korespondují s parametry subklinického zánětu a glykemické kompenzace a po intervencích vedoucích k poklesu hmotnosti (nízkokalorická dieta, bariatrická chirurgie) se jejich hladiny přibližují nebo zcela vracejí k normálním hodnotám.

Cíle práce

- Zhodnotit změny sérových koncentrací vybraných faktorů a jejich mRNA exprese v podkožní a viscerální tukové tkáni po vystavení akutnímu stresu, kterým je pro organismus operace v hluboké hypotermii. Dále zhodnotit, zda má hluboká hypotermie vliv na vznik lokální zánětlivé odpovědi v tukové tkáni a zda se podílí na vzniku hypoxie nebo její vznik v tukové tkáni naopak potlačuje.
- Zhodnotit změny v endokrinní funkci tukové tkáně u pacientů s obezitou a diabetes mellitus 2. typu, s primárním zaměřením na clusterin, jakožto jeden z faktorů potenciálně se podílejících na vzniku inzulínové rezistence. U tohoto faktoru je specifickým cílem posoudit vliv různých intervencí (nízkokalorická dieta, bariatrická chirurgie) na jeho sérové hladiny a mRNA expresi v podkožní tukové tkáni. Dalším cílem je posoudit akutní regulační roli inzulínu a glukózy na sérové hladiny a mRNA expresi clusterinu v podkožní tukové tkáni pomocí hyperinzulinemického euglykemického clampu.

7. Metodika studie

Všichni pacienti před vstupem do studie podepsali informovaný souhlas. Studie byly schváleny etickou komisí 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a byly prováděny v souladu s doporučeními Helsinské deklarace Světové lékařské asociace.

7.1. Soubory vyšetřovaných osob, protokoly studií a odběr vzorků

7.1.1. Studie 1 – Vliv hluboké hypotermie na zánětlivou reakci v tukové tkáni: studie u pacientů podstupujících elektivní kardiochirurgickou operaci

Do studie bylo zařazeno 10 pacientů (8 mužů, 2 postmenopauzální ženy), kteří byli indikováni k endarterektomii plicnice s napojením na mimotělní oběh v hluboké hypotermii (dále budou označováni jako hypotermní skupina). Všichni pacienti z této skupiny měli chronickou plicní hypertenzi. 2 pacienti měli diagnostikovaný diabetes mellitus 2. typu. Pro lepší interpretaci výsledků jsou data částečně porovnávána s kontrolní skupinou, kterou tvoří 10 mužů, kterým byl proveden aorto-koronární bypass s napojením na mimotělní oběh bez uvedení do hluboké hypotermie. Všichni pacienti v kontrolní skupině měli arteriální hypertenzi a ischemickou chorobu srdeční. U žádného z nich nebyl diagnostikován diabetes mellitus 2. typu. Žádný z pacientů zařazených do studie netrpěl akutním nebo chronickým selháním ledvin, neměl zhoubný nádor, onemocnění štítné žlázy ani akutní infekci.

Operace endarterektomie plicnice začala u všech pacientů po celonočním lačnění mezi 8:30 a 9:00 hodinou ranní. Průměrná délka operace byla $434,0 \pm 18,9$ min. Zchlazování pacienta do hluboké hypotermie (tělesná teplota $16,6 \pm 0,19$ °C) bylo zahájeno ihned po zavedení kardiopulmonárního bypassu. Po uchycení aorty byla infuzí kardioplegického roztoku St. Thomas (ArdeaPharma a.s., Česká republika) navozena srdeční zástava. Byl použit standardní protokol aprotitinu (Gordox, Gedeon Richter, Maďarsko) s 2 miliony jednotek před kardiopulmonárním bypasselem (CPB) a 2 miliony jednotek do "pump prime" a následně 0,5 milionu jednotek každou hodinu během operace až do návratu na jednotku intenzivní péče. Pro vlastní endarterektomii plicnice, tedy odstranění zesílené vnitřní části tepny způsobující zúžení, bylo nutné navodit zcela bezkrevné prostředí pomocí opakovaných period zástavy tělního oběhu v hluboké hypotermii střídaných se spouštěním kardiopulmonárního bypassu. Po dokončení endarterektomie obou větví plicnice byl obnoven CPB a pacient byl pomalu ohříván na normální teplotu. Odpojení od CPB bylo docíleno postupnou redukcí průtoku

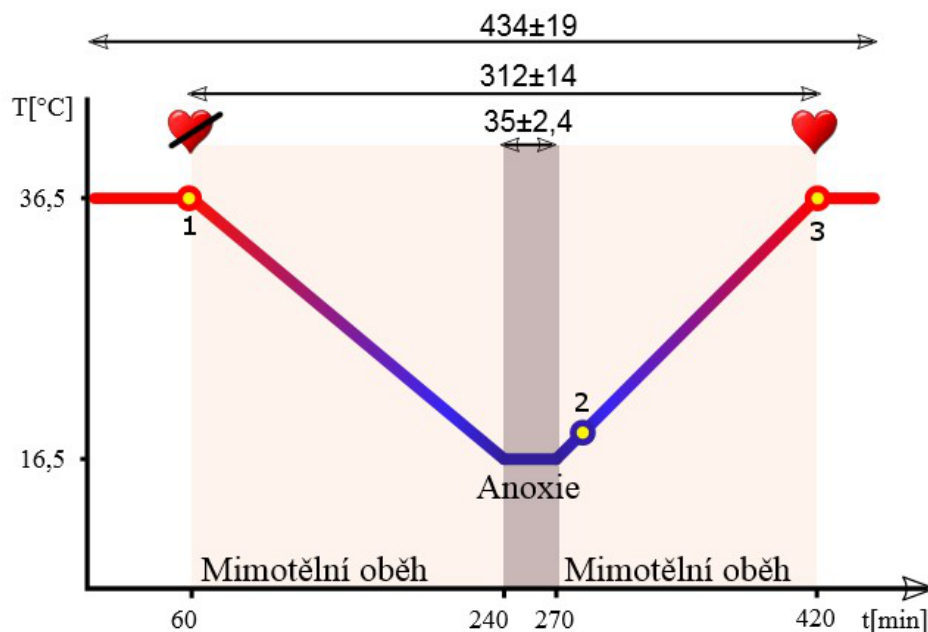
pumpy a nízkými dávkami noradrenalinu. Před ukončením CPB byla provedena ultrafiltrace zředěné krve s dosažením hemokoncentrace.

Operace aorto-koronární bypass začala u všech pacientů po celonočním lačnění mezi 7:00 a 8:00 hodinou ranní. Průměrná délka operace byla $278,0 \pm 8,8$ minut. Tři pacienti dostali v průběhu a po operaci infuzi dobutaminu s maximální dávkou $7 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ nebo noradrenalinu s maximální dávkou $0,2 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ po dobu 14 až 31 hod. Žádnému z pacientů nebyla podávána infuze glukózy. Normální perorální příjem potravy byl zahájen 18 až 24 hodin po operaci.

Jeden den před operací byli všichni pacienti změřeni a zváženi a byl vypočítán BMI (hmotnost v kg děleno výška v m^2) a tělesný povrch pomocí vzorce DuBois a DuBois.

Vzorky krve byly pacientům v hypotermní skupině odebrány z arteriálního katétru ve stehně bazálně (před začátkem operace), na začátku operace (těsně po sternotomii), na konci hluboké hypotermie, na konci operace a 4, 10, 16, 28 a 40 hodin po konci operace. U kontrolní skupiny byly získány vzorky pouze bazálně (před zahájením anestezie). Do 30 minut od odebrání byly vzorky centrifugovány 15 min při RCF 1000 a séra byla dále uskladněna do dalšího zpracování při -80°C .

Vzorky podkožní (z hrudní oblasti, SAT) a viscerální (v okolí epikardu, zde označován jako EAT) tukové tkáně byly odebírány na začátku a konci hypotermie a na konci operace u hypotermní skupiny (schéma odběrů je znázorněno na obrázku 4) a na začátku těsně před koncem operace u kontrolní skupiny. Všechny vzorky byly odebírány z přibližně stejné oblasti. Aby nedocházelo k ovlivnění zkoumaných parametrů díky místnímu poškození tkáně, byly vzorky odebírány vždy z tkáně, která nebyla při předchozích odběrech mechanicky poškozena nebo kauterizována. Ihned po odběru byly z tukové tkáně izolovány adipocyty nebo byly vzorky celkového tuku uloženy do RNA stabilizujícího roztoku (RNAlater, Qiagen, Hilden, Germany) a následně do dalšího zpracování skladovány při -80°C .



Obrázek 4: Schéma průběhu operace a odběrů tukové tkáně u hypotermní skupiny.
Odběry tukové tkáně: 1. bazální odběr - na začátku hypotermie (těsně po sternotomii), 2. na konci hypotermie, 3. na konci operace

7.1.2. Studie 2 – Clusterin u pacientů s obezitou a diabetes mellitus 2. typu: vliv krátkodobé hyperinzulinémie, nízkokalorické diety a bariatrické operace

Tato studie se skládá ze tří podstudií – zkoumali jsme pacienty, kteří podstoupili nízkokalorickou dietu, bariatrickou operaci a euglykemický hyperinzulinemický clamp (HEC). Jako kontrolní skupina pak bylo zařazeno patnáct zdravých štíhlých žen ($\text{BMI } 20\text{-}25 \text{ kg/m}^2$).

Zdravé štíhlé probandky a pacienti, kteří podstoupili HEC, byli vyšetřováni pouze jednou. Ostatní pacienti byli vyšetřováni opakovaně. Pacienti zařazení do redukčního programu byli vyšetřeni bazálně a po 2 týdnech nízkokalorické diety. Pacienti, kteří podstoupili bariatrickou operaci, byli vyšetřováni bazálně, tedy 1 týden před operací a následně 6 a 12 měsíců po operaci.

Pacienti byli vždy změřeni a zváženi a byl vypočítán jejich BMI. Krevní vzorky jim byly odebrány po 12hodinovém lačnění. Do 30 minut od odebrání byly vzorky centrifugovány 10 minut při RCF 1000 a sérum a plazma byly dále uskladněny do dalšího zpracování při -80°C .

Vzorky podkožní tukové tkáně byly odebírány z abdominální oblasti pomocí podkožní jehlové aspirační biopsie. U pacientů, kteří podstoupili HEC, byla biopsie provedena dvakrát – před začátkem a 30 minut po ukončení HEC. Místo odběru bylo dezinfikováno a

zarouškováno. Po lokálním znecitlivění 20 ml 1% trimecainu (Mesocain 1% injekční roztok) byl skalpelem proveden krátký řez (3-4 mm), kterým byla paralelně s břišní stěnou zavedena plastová kanyla s kovovým zavaděčem (Braunüle MT, 12G, délka 80 mm, vnitřní/vnější průměr 2,2/2,7 mm, Braun Melsungen, Německo). Podkožní tuková tkáň byla opatrně mechanicky rozrušena kovovým zavaděčem, který byl následně vyjmut, a na kanylu byla připojena 20 ml stříkačka a pomocí podtlaku bylo odebráno požadované množství tukové tkáně (200-1000 mg). Ihned po odběru byly vzorky tukové tkáně rozděleny po cca 100 mg alikvotách a uloženy do RNA stabilizujícího roztoku (RNAlater, Qiagen, Hilden, Německo) a následně do dalšího zpracování skladovány při -80 °C.

7.1.2.1 Nízkokalorická dieta

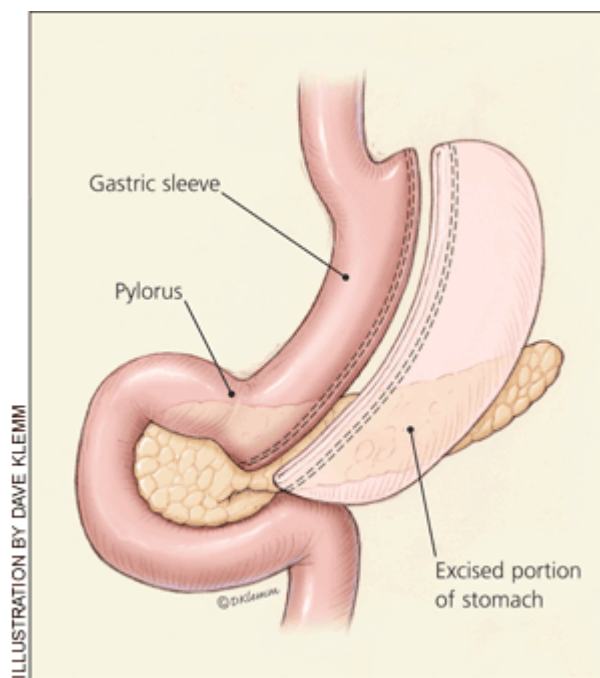
Do studie bylo zařazeno 15 obézních žen bez (OB skupina) a s diabetes mellitus 2. typu (DM2 skupina), které podstoupily dvoutýdenní nízkokalorickou dietu (VLCD) s energetickým příjmem 2500 kJ/den (600 kcal/den) o složení:

- 50 g (33 %) sacharidů (15-20 g mono-/ di-sacharidů, 30-35 g polysacharidů) /den
- 20 g (31 %) lipidů (6-8 g nasycených MK, 12-14 g nenasycených MK) / den
- 55 g (36 %) bílkovin / den
- 20 g vlákniny / den

Během redukčního programu byly pacientky hospitalizovány na 3. interní klinice Všeobecné fakultní nemocnice v Praze.

7.1.2.2 Sleeve gastrektomie

Deset obézních žen bez diabetes mellitus 2. typu, které podstoupily restriktivní bariatrickou operaci – laparoskopickou sleeve gastrektomii (LSG) na Chirurgické klinice Ústřední Vojenské nemocnice Praha. Patientky byly k podstoupení LSG indikovány na základě kritérií doporučených Evropskou společností pro obezitu (Fried *et al.* 2013).



Obrázek 5: Schéma žaludku po laparoskopické sleeve gastrektomii.
Upraveno dle (Schroeder *et al.* 2011)

7.1.2.3 Hyperinzulinemický euglykemický clamp

Osm pacientů s DM2, osm pacientů s porušenou glukózovou tolerancí (impaired glucose tolerance, IGT) a osm normoglykemických pacientů podstoupilo euglykemický hyperinzulinemický clamp. Každá skupina se skládala ze 4 žen a 4 mužů a všichni pacienti měli BMI mezi 20 a 35 kg/m².

HEC byl zahájen inzulinovou infuzí o dávce dle BMI pacienta - 2 mIU·kg⁻¹·min⁻¹ pro pacienty s BMI < 30 kg/m² nebo 80 mIU·m⁻²·min⁻¹ pro pacienty s BMI ≥ 30 kg/m². Po 5 minutách byla rychlost infuze snížena na polovinu a tato infuzní rychlost pak zůstala konstantní po zbytek testu. Během testu byla každých 5 minut měřena plazmatická glykémie. Pro dosažení euglykémie byla 5 minut po zahájení inzulinové infuze spuštěna infuze glukózy. Rychlost infuze glukózy byla během testu upravována tak, aby bylo mezi 150 a 180 minutách testu dosaženo stabilní normoglykémie. Pro určení míry inzulinové senzitivity byl spočítán Index inzulinové senzitivity (Insulin Sensitivity Index - MCR_{glc/I}, ml·kg⁻¹·min⁻¹ na μIU·ml⁻¹) jako

metabolická clearance pro glukózu (MCR_{glc} , $ml \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$) děleno průměrnou dávkou inzulínu ($\mu IU \cdot ml^{-1}$) podávaného v infuzi během 150 – 180 minuty testu.

7.2. Stanovení biochemických a hormonálních parametrů z krevních vzorků

Sérové koncentrace interleukinu 6 a 8, solubilního receptoru pro tumor nekrotizující faktor 1 (soluble tumor necrosis factor receptor 1, sTNF-R1) a solubilního receptoru pro interleukin 2 (soluble interleukin-2 receptor, sIL-2R) byly pro hypotermní skupinu v první studii měřeny komerčními ELISA kity (Millipore, MA, USA). Sérové hladiny prokalcitoninu a C-reaktivního proteinu pro první studii byly měřeny pomocí ultrasenzitivní analýzy (Kryptor - TRACE technology, BRAHMS, Henningsdorf, Německo). Všechny vzorky byly měřeny minimálně v duplikátech v Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. Variabilita v rámci měření a mezi měřeními byla u všech stanovení do 5 %.

Pro kontrolní skupinu v první studii byly bazální sérové hladiny IL-6 a IL-8 měřeny pomocí Human serum adipokine LINCOplex Kit (panel B) na přístroji Luminex 200 (Linco Research, St. Charles, MO, USA). Variabilita v rámci měření a mezi měřeními byla 7,8 % a 18 % pro IL-6 a 7,9 % a 15 % pro IL-8.

Plazmatické hladiny clusterinu a leptinu byly měřeny pomocí komerčních ELISA kitů (BioVendor, Brno, Česká republika). Senzitivita byla $0,5 \text{ ng} \cdot ml^{-1}$ pro clusterin a $0,12 \text{ ng} \cdot ml^{-1}$ pro leptin. Sérové koncentrace inzulínu byly měřeny komerčním RIA kitem (Cis Bio International, Gif-sur-Yvette Cedex, Francie) se senzitivitou $2,0 \text{ IU} \cdot ml^{-1}$. Pro druhou studii byl sérový C-reaktivní protein měřen vysoce senzitivní metodou (eBioscience, Vídeň, Rakousko) - senzitivita $3 \text{ pg} \cdot ml^{-1}$. Variabilita v rámci měření byla pro všechny analyty do 7 % a variabilita mezi měřeními byla pro všechny analyty do 10 %.

Základní biochemické parametry (glukóza, glykovaný hemoglobin, triglyceridy, celkový a HDL cholesterol) byly měřeny a LDL cholesterol byl dle Friedwaldova vzorce vypočítán v Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. HOMA-IR index byl vypočítán ze sérové koncentrace inzulínu ($C_{\text{inzulín nalačno}}$) a glykémie ($C_{\text{glukóza nalačno}}$) dle vzorce:

$$\text{HOMA-IR} = \frac{C_{\text{inzulín nalačno}} (mIU \cdot l^{-1}) \cdot C_{\text{glukóza nalačno}} (mmol \cdot l^{-1})}{22,5}$$

7.3. Izolace adipocytů z tukové tkáně

Z tukové tkáně získané biopsií byl ihned po odběru oddělen cca 1 g a ten byl vložen do zkumavky s 5 ml sterilního roztoku KRBHA, glukózy a hovězího sérového albuminu ($118,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl, $4,75 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ KCl, $2,70 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ CaCl₂, $1,19 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ KH₂PO₄, $1,09 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ MgSO₄ · 7 H₂O, $25 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaHCO₃, $5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ glukóza a 3,33% hovězí sérový albumin) vytemperovaného na 37 °C. Do 10 minut byla tkáň nastříhána na malé kousky a přesunuta do 5 ml sterilního KRBHA média s 0,3% kolagenázou typu VIII (z *Clostridium histolyticum*, Sigma–Aldrich, Německo) a inkubována 35 minut ve vodní lázni při 37 °C s třepáním 120 kmitů za minutu.

Enzymaticky rozštěpená tkáň byla přefiltrována přes jemné nylonové sítko s póry o velikosti 250 µm (Spectrum Laboratories, Inc., CA, USA). Vrstva adipocytů plovoucí na povrchu byla odebrána a třikrát promyta KRBHA médiem a centrifugována po dobu 30 minut s RCF 200. Z izolovaných adipocytů byla ihned izolována celková RNA nebo byly uskladněny při -80 °C do dalšího zpracování.

7.4. Izolace RNA a stanovení mRNA exprese

Vzorky podkožní a epikardiální tukové tkáně byly homogenizovány pomocí homogenizátoru MagNA Lyser s použitím MagNA Lyser Green Beads (Roche Diagnostics GmbH, Německo). Celková RNA byla z homogenizovaných vzorků tukové tkáně nebo přímo z izolovaných adipocytů extrahována na principu magnetické separace na přístroji MagNA Pure s použitím kitů MagNA Pure Compact RNA Isolation (Tissue) kit (Roche Diagnostics GmbH, Německo). Koncentrace RNA byla následně stanovena pomocí spektrofotometru (BioPhotometer, Eppendorf AG, Německo – první studie nebo NanoPhotometer, Implen, Mnichov, Německo – druhá studie) pomocí absorbance při 260 nm. Integrita RNA byla kontrolována pomocí poměrů absorbancí při 260 a 280 nm, u části vzorků navíc vizualizací 18S a 28S ribozomálních bandů na 1 % agarózovém gelu s ethidium bromidem.

Do reverzní transkripce bylo v případě první studie použito 0,3 µg celkové RNA pro syntézu cDNA s využitím kitu RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis kit (Fermentas Life Science, Litva) obsahujícího oligo (dT)18 primery. Pro druhý pak bylo použito 0,25 µg celkové RNA s využitím kitu High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) obsahujícího náhodné primery.

Měření exprese vybraných genů bylo provedeno na přístroji ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) s využitím TaqMan® Universal PCR Master Mix II,

NO UNG a specifických komerčně dostupných sond TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) – tabulka 2. cDNA byla pro reakci ředěna vodou bez nukleáz (Fermentas Life Science, Vilnius, Lithuania) a všechny vzorky byly měřeny minimálně v duplikátu. Nárůst fluorescence byl měřen v reálném čase a byly stanoveny hodnoty CT (threshold cycle). Pro kompenzaci nepřesností pipetování a různé účinnosti reverzní transkripce byly CT hodnoty zkoumaných genů normalizovány na CT hodnoty endogenní kontroly beta-2-mikroglobulinu. Relativní mRNA genová exprese byla vypočítána s použitím metody $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Tabulka 2: Seznam sond použitých pro qRT-PCR.

Gen	Používaná zkratka	Označení sondy
B-cell lymphoma 2	BCL-2	Hs99999018_m1
Beta-2-mikroglobulin	B2M	Hs99999907_m1
Clusterin	-	Hs00156548_m1
Faktor inhibující migraci makrofágů	MIF	Hs00236988_g1
Glukózový transportér 1	GLUT1	Hs00892681_m1
Glutathion peroxidáza 1	GPX1	Hs00829989_gH
Glypican 4	GPC4	Hs00155059_m1
Hypoxii indukující faktor 1 s α podjednotkou	HIF1- α	Hs00936370_m1
Chemerin	-	Hs00161209_g1
Interleukin 6	IL-6	Hs00985639_m1
Inzulín receptor substrát 1	IRS1	Hs00178563_m1
Leptin	-	Hs00174877_m1
Metallothionein 3	MT3	Hs00359394_g1
Monocyty přitahující protein 1	MCP-1	Hs00234140_m1
Netrin 1	-	Hs00924151_m1
Tumory nekrotizující faktor α	TNF- α	Hs00174128_m1

7.5. Stanovení množství proteinů pomocí proteinových arrayí

Přibližně 100 mg podkožní tukové tkáně uchovávané při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ v RNA lateru bylo opatrně rozmrazeno a přeneseno do ledového homogenizačního pufru ($150\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl, $2\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA, 10% glycerol, $25\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ benzamidin, $1\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ PMSF a Protease inhibitor cocktail (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) v $10\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl (pH 7,0)) a 10 minut sonikováno. Homogenát byl centrifugován 15 minut při RCF 3000 a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Z povrchu byla odstraněna vysrážená tuková vrstva a homogenát byl opět centrifugován 20 minut při RCF $14000 \times g$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Množství celkového proteinu v supernatantu bylo stanoveno Bradfordovou metodou pomocí Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) za použití hovězího sérového albuminu jako standardu.

Na každou array (Human Apoptosis Antibody Array, R&D System, Inc., Minneapolis, MN, USA) bylo nanášeno $350\text{ }\mu\text{g}$ celkového proteinu a array byla zpracována dle manuálu

výrobce. Detekce protilátek navázaných na membránu byla provedena pomocí SuperSignal West Dura Chemiluminescent ECL Substrate (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA). Fluorescenční signál byl snímán na přístroji G:Box iChem XT Bio instrument (Syngene, Cambridge, Velká Británie). Výsledky byly analyzovány a kvantifikace jednotlivých bandů představujících 35 různých proteinů byla provedena pomocí programu GeneTools Software (Syngene, Cambridge, Velká Británie).

7.6. Statistická analýza dat

Statistická analýza dat byla u první studie provedena pomocí programu SigmaStat software 3.0 a grafy byly vytvořeny pomocí programu Sigma Plot software 8.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). U druhé studie byl pro vyhodnocení i tvorbu grafů použit program SigmaPlot 13.0 software (Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA).

Výsledky jsou dle normality dat vyjádřeny jako průměr \pm standartní chyba průměru nebo jako medián (interkvartilové rozpětí). Před samotnou analýzou byla normalita všech kontinuálních dat stanovena pomocí Kolmogorova-Smirnovova testu. K vyhodnocení byly dle typu dat použity pro porovnání dvou skupin párový t-test případně pro data s nenormálovým rozdělením Wilcoxonův test. Pro porovnání více skupin dat pak jednocestná analýza rozptylu (ANOVA) pro závislé nebo nezávislé výběry případně neparametrické varianty (Kruskal-Wallisova jednocestná analýza rozptylu, Friedmanova analýza rozptylu pro opakované výběry) spolu s příslušnými post-hoc testy (Fisherova LSD metoda, Holm-Sidakova metoda, Dunnova metoda, Dunnettův test).

Pro stanovení závislosti mezi jednotlivými faktory byl dle normality dat použit Pearsonův nebo Spearmanův korelační test a mnohočetné regresní analýzy s užitím metody zpětné selekce proměnných (Backward stepwise variable selection method).

Jako statisticky signifikantní byla pro všechny testy určena hodnota $p < 0,05$.

8. Výsledky

8.1. Vliv hluboké hypotermie na zánět, tkáňovou hypoxii a endokrinní funkci tukové tkáně během kardiochirurgické operace

Výsledky hypotermní skupiny byly v roce 2014 publikovány v časopise Cryobiology. Plný text článku v otištěné verzi je uveden v příloze.

8.1.1. Bazální charakteristiky pacientů zařazených do studie

Antropometrické, biochemické a hormonální charakteristiky pacientů zařazených do studie a charakteristiky operace jsou shrnuty v tabulce 3.

Tabulka 3: Bazální klinické, hormonální a metabolické charakteristiky pacientů zařazených do studie a charakteristika operace.

	Hypotermní skupina	Kontrolní skupina	p
Počet subjektů (ženy/muži)	10 (2/8)	10 (0/10)	NS
Věk (roky)	61,0 ± 4,3	67,0 ± 2,0	NS
BMI (kg/m ²)	25,3 ± 1,5	27,9 ± 0,5	NS
Tělesný povrch (m ²)	1,91 ± 0,06	1,97 ± 0,02	NS
Délka operace (min)	434,0 ± 18,9	278,0 ± 8,8	< 0,001
Délka CPB (min)	312,3 ± 14,0	NA	NA
Celková délka zástavy tělního oběhu v hluboké hypotermii (min)	35,3 ± 2,4	NA	NA
Minimální tělesná teplota (°C)	16,6 ± 0,2	34,8 ± 0,3	< 0,001
Glykémie (mmol·l ⁻¹)	4,8 ± 0,4	5,7 ± 0,3	NS
IL-6 (pg·ml ⁻¹)	7,1 ± 2,1	3,8 ± 1,6	NS
IL-8 (pg·ml ⁻¹)	5,6 ± 1,0	4,0 ± 1,0	NS
C-reaktivní protein (mg·l ⁻¹)	0,43 ± 0,27	0,41 ± 0,09	NS
sTNF-RI (pg·ml ⁻¹)	345,7 ± 50,0	NA	NA
Prokalcitonin (ng·ml ⁻¹)	0,198 ± 0,105	NA	NA
sIL-2R (pg·ml ⁻¹)	425,6 ± 65,0	NA	NA

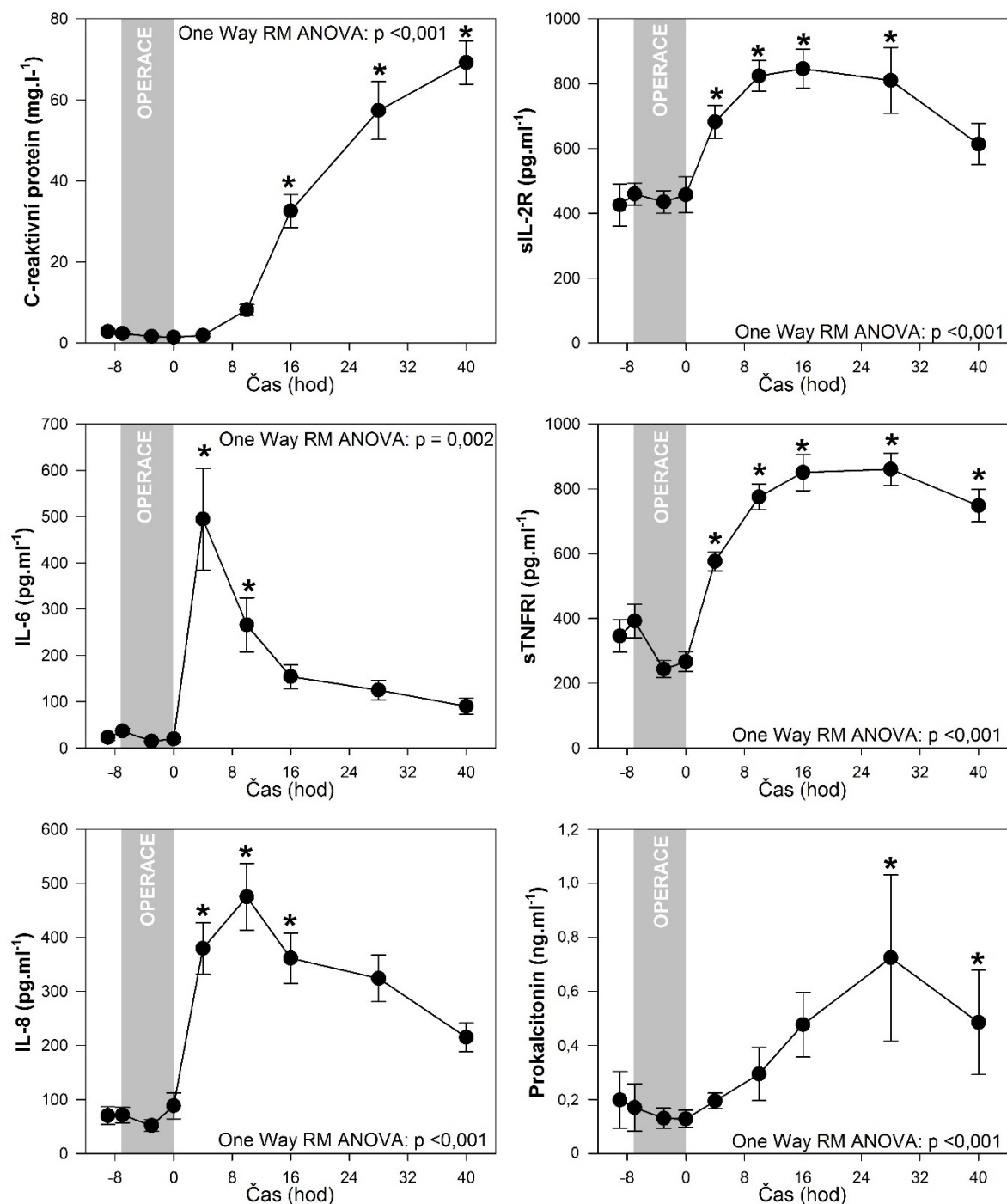
BMI - index tělesné hmotnosti (body mass index), CPB – kardiopulmonární bypass, IL- interleukin, NA – data nejsou dostupná (not available), NS – statisticky nevýznamný (not significant), sTNF-RI - solubilního receptor pro tumor nekrotizující faktor 1.

Výsledky jsou uváděny jako průměr ± standardní chyba průměru.

8.1.2. Sérové koncentrace vybraných faktorů u pacientů podstupujících operaci s navozením hluboké hypotermie

Sérové koncentrace IL-6, IL-8, C-reaktivního proteinu (CRP), sIL-2R, sTNFRI a prokalcitoninu před, v průběhu a po operaci jsou pro hypotermní skupinu shrnuty na obrázku 6. Všechny měřené zánětlivé parametry zůstaly během operace nezměněny, k první významné změně jejich hladiny došlo až 4 hodiny po ukončení operace. Sérová koncentrace CRP byla významně zvýšena 16 hodin po konci operace (11,5 násobek bazální hodnoty, $p < 0,05$) a nejvyšší hodnotu dosáhla ve 40. hodině po konci operace (24,5 násobek bazální hodnoty,

$p < 0,05$). Hladina IL-6 dosáhla maxima 4 hodiny (21,5 násobek bazální hodnoty, $p < 0,05$), zůstala zvýšena 10 hodin po ukončení operace (11,5 násobek bazální hodnoty, $p < 0,05$) a následně začala pomalu klesat. Hladina IL-8 významně vzrostla 4 hodiny, maxima dosáhla 10 hodin a zůstala zvýšena ještě 16 hodin po operaci (5,4, 6,8 a 5,2 násobek bazální hodnoty, $p < 0,05$). sIL-2R signifikantně vzrostl 4 hodiny, maxima dosáhl 16 hodin a zůstal zvýšen ještě 28 hodin po konci operace (1,6, 2,0 a 1,9 násobek bazální hodnoty, $p < 0,05$). Hladina sTNFR1 signifikantně vzrostla 4 hodiny (1,7 násobek bazální hodnoty, $p < 0,05$), maxima dosáhla mezi 16. a 28. hodinou (2,5 násobek bazální hodnoty, $p < 0,05$) a zůstala 2,2 násobně zvýšena ještě 40 hodin po konci operace ($p < 0,05$). Hladina prokalcitoninu vykazovala nejpomalejší nárůst s maximem až 28 hodin (3,7 násobek bazální hodnoty, $p < 0,05$) a zůstala 2,4 násobně zvýšena 40 hodin po konci operace ($p < 0,05$).



Obrázek 6: Operací vyvolané změny sérových koncentrací IL-6, IL-8, CRP, sIL-2R, sTNFRI a prokalcitoninu během operace a 40 hod po jejím skončení u hypotermní skupiny.

IL- interleukin, sTNFRI - solubilního receptor pro tumor nekrotizující faktor 1.

Výsledky jsou uváděny jako průměr ± standardní chyba průměru. Statistická významnost byla hodnocena na základě jednocestné analýzy rozptylu pro závislé výběry a Dunnettova testu. * $p < 0,05$ vs. bazální odběr.

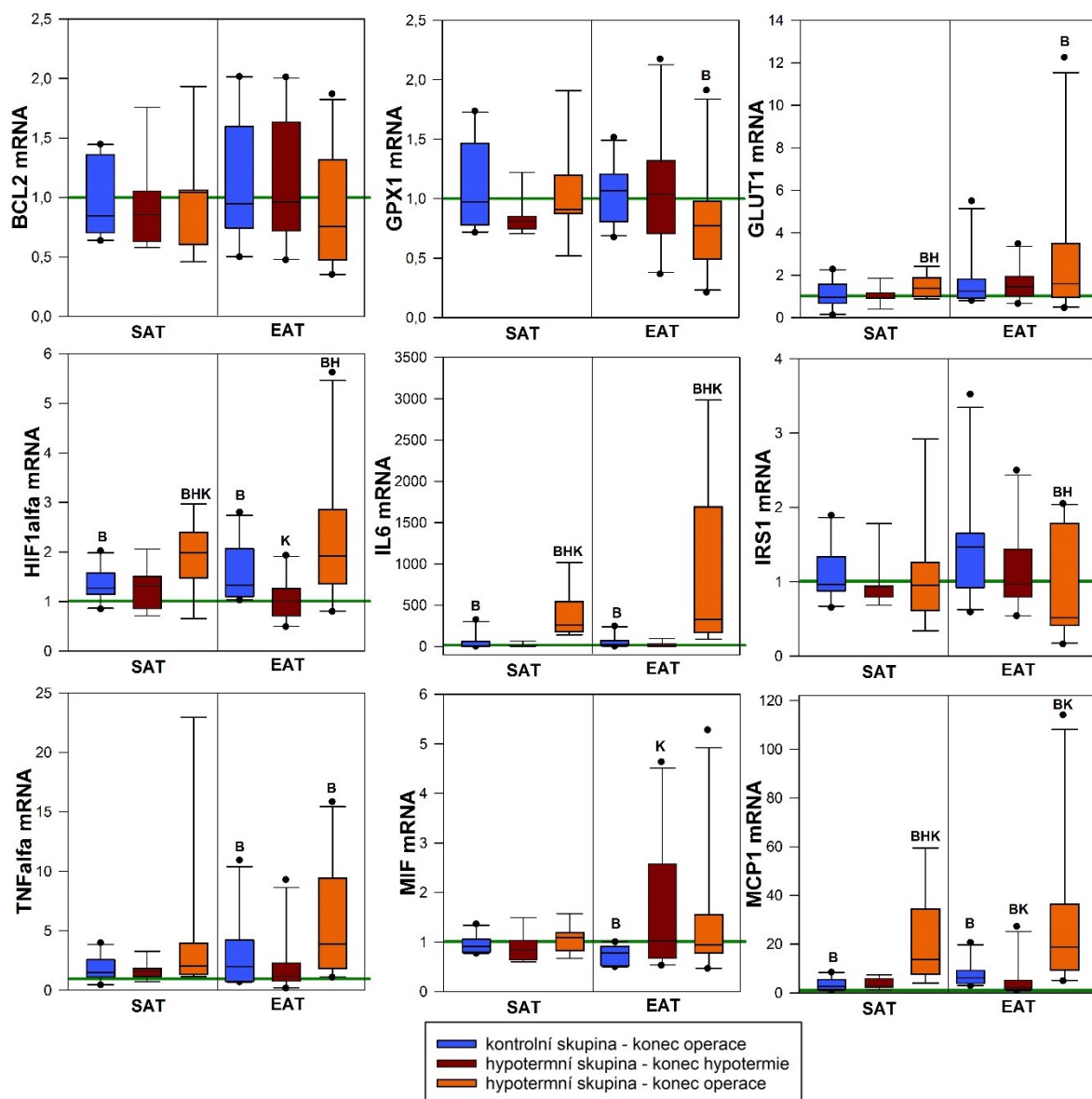
8.1.3. mRNA exprese u pacientů podstupujících operaci s nebo bez hluboké hypotermie

Výsledky mRNA exprese pro hypotermní skupinu celkem 10 genů souvisejících s metabolismem glukózy (GLUT1, IRS1), zánětem (TNF- α , IL-6, MCP-1, MIF) a oxidačním

stresem a apoptózou (BCL-2, GPX1, HIF1- α , MT3) jsou shrnuty pro celkovou tukovou tkáň v tabulce 4 a izolované adipocyty v tabulce 5. mRNA exprese TNF- α v izolovaných adipocytech a mRNA exprese MT3 ve všech typech vzorků byly pod detekčním limitem, a proto je nebylo možno vyhodnotit. V SAT byla na konci operace oproti začátku operace i konci hypotermní fáze zvýšena exprese prozánětlivých faktorů IL-6 a MCP-1, hypoxií-indukovaného faktoru HIF1- α a glukózového transportéru GLUT1. IL-6 vykazoval stejný průběh i v EAT, zatímco MCP-1, GLUT1 a TNF- α byly na konci operace významně zvýšeny pouze oproti bazální hodnotě. Expresi IRS1 a antioxidačního enzymu GPX1 byla na konci operace v EAT dokonce snížena, v SAT jsme snížení exprese u žádného ze zkoumaných genů nezjistili. U žádného ze zkoumaných genů v SAT ani EAT nedošlo k statisticky významné změně mRNA exprese již na konci hypotermie oproti bazální hodnotě. Izolované adipocyty ze SAT i EAT vykazovaly zvýšenou expresi IL-6 a MCP-1 na konci operace oproti začátku operace i konci hypotermní fáze. U ostatních zkoumaných genů jsme v celkové tukové tkáni ani izolovaných adipocytech nezjistili významné změny v mRNA expresi.

U kontrolní skupiny byly zjištěny podobné změny v mRNA expresi s nárůstem exprese IL-6, MCP-1 a HIF1- α v SAT i EAT. Expresi TNF- α byla zvýšena a MIF naopak snížena na konci operace oproti bazálním hodnotám v EAT, ale ne v SAT.

Porovnání mRNA exprese u kontrolní a hypotermní skupiny je znázorněno na obrázku 7. Při porovnání mRNA exprese v SAT u obou sledovaných skupin pacientů, jsme nenalezli žádný rozdíl ve sledovaných faktorech mezi hypotermní skupinou na konci hypotermie a kontrolní skupinou na konci operace, tedy v odběrech provedených ve srovnatelném čase od začátku operace ($312 \pm 14,0$ vs. $278 \pm 8,8$ min, NS). Při porovnání odběrů na konci obou operací byla exprese HIF1- α , MCP-1 a IL-6 v SAT významně zvýšená u hypotermní skupiny. Ovšem hypotermní operace trvala přibližně 1,6 krát déle než operace bez hypotermní periody. V EAT byla mRNA exprese HIF1- α , MCP-1 a MIF dokonce snížena na konci hypotermní fáze v porovnání s koncem operace u kontrolní skupiny. MCP-1 a IL-6 bylo i v EAT na konci hypotermní operace signifikantně vyšší než u kontrolní operace.



Obrázek 7: Změny mRNA exprese v celkovém podkožním a epikardiálním tuku u hypotermní a kontrolní skupiny.

Data jsou vyjádřena jako násobek bazální mRNA exprese pro příslušnou skupinu a tkáň – bazální (před začátkem operace) relativní mRNA exprese je brána jako 1 a je znázorněna zelenou linií. Hodnoty mRNA exprese byly normalizovány k endogenní kontrole beta-2-mikroglobulinu. Statistická významnost byla hodnocena v rámci každé skupiny na základě jednocestné analýzy rozptylu pro závislé výběry a Dunnettova testu. Porovnání hypotermní a kontrolní skupiny bylo provedeno pomocí t-testu nebo jeho neparametrické verze. ^B $p < 0,05$ vs. bazální hodnota, ^H $p < 0,05$ vs. konec hypotermie, ^K $p < 0,05$ vs. kontrolní skupina na konci operace.

Tabulka 4: mRNA exprese v celkové podkožní a epikardiální tukové tkáni u hypotermní skupiny.

gen	Subkutánní tuková tkáň				Epikardiální tuková tkáň			
	Bazál	Konec hypotermie	Konec operace	p	Bazál	Konec hypotermie	Konec operace	p
BCL2	0,21 (0,16-0,25)	0,23 (0,13-0,29)	0,21 (0,17-0,29)	0,828	0,18 (0,13-0,40)	0,25 (0,12-0,31)	0,16 (0,13-0,25)	0,150
GPX1	0,08 (0,05-0,10)	0,07 (0,06-0,09)	0,08 (0,07-0,09)	0,749	0,08 (0,05-0,12)	0,07 (0,06-0,09)	0,06 (0,04-0,06) ^B	0,049
GLUT1	0,54 (0,38-0,63)	0,58 (0,32-0,66)	0,66 (0,55-0,89) ^{BH}	0,014	0,67 (0,38-0,81)	0,58 (0,54-1,30)	1,01 (0,68-1,41) ^B	0,045
HIF1- α	1,07 (0,58-1,64)	1,27 (0,99-1,55)	1,62 (1,33-2,17) ^{BH}	0,001	1,42 (1,01-1,63)	1,31 (1,04-1,73)	2,56 (2,14-2,81)	0,067
IL- 6	0,06 (0,04-0,09)	0,63 (0,25-1,18)	14,65 (11,63-25,90) ^{BH}	<0,001	0,06 (0,02-0,10)	0,33 (0,07-1,50)	34,11 (14,07-70,95) ^{BH}	0,005
IRS1	0,15 (0,12-0,20)	0,13 (0,11-0,18)	0,15 (0,09-0,18)	0,971	0,16 (0,06-0,23)	0,14 (0,11-0,24)	0,09 (0,05-0,11) ^{BH}	0,047
TNF- α	0,40 (0,37-1,00)	0,83 (0,64-1,26)	1,33 (0,79-1,48)	0,088	1,19 (0,56-1,30)	1,40 (1,08-2,07)	3,39 (2,15-6,58) ^B	0,006
MIF	0,18 (0,13-0,23)	0,18 (0,14-0,19)	0,18 (0,15-0,22)	0,503	0,18 (0,15-0,21)	0,19 (0,15-0,26)	0,20 (0,15-0,24)	0,745
MCP-1	0,23 (0,17-0,37)	0,53 (0,43-1,61)	3,24 (2,11-4,93) ^{BH}	<0,001	0,37 (0,25-0,54)	0,91 (0,42-3,59)	9,44 (3,44-11,23) ^B	<0,001

Výsledky jsou uváděny jako medián (interkvartilové rozpětí). Statistická významnost byla dle normality dat hodnocena na základě jednocestné analýzy rozptylu pro závislé výběry nebo její neparametrické verze a výsledky post-hoc testů jsou zobrazeny jako: ^B p < 0,05 vs. bazální odběr, ^H p < 0,05 vs. konec hypotermie.

Tabulka 5: mRNA exprese v adipocytech izolovaných z podkožní a epikardiální tukové tkáně u hypotermní skupiny.

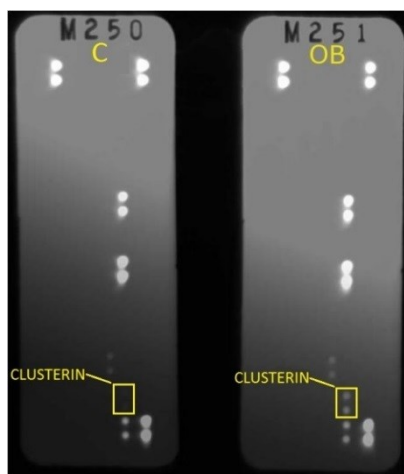
Gen	Podkožní tuková tkáň – izolované adipocyty				Epikardiální tuková tkáň – izolované adipocyty			
	Bazál	Konec hypotermie	Konec operace	p	Bazál	Konec hypotermie	Konec operace	p
BCL2	0,77 (0,45-3,49)	1,03 (0,92-1,74)	2,01 (1,09-2,62)	0,801	1,39 (0,90-2,30)	1,35 (0,45-2,92)	2,44 (1,73-2,80)	0,524
GPX1	0,93 (0,47-1,83)	1,47 (0,96-2,65)	2,04 (1,33-3,16)	0,305	1,47 (0,72-2,21)	1,53 (0,85-3,68)	1,88 (0,93-4,45)	0,252
GLUT1	0,82 (0,48-2,20)	1,27 (0,64-1,96)	1,19 (0,90-2,14)	0,433	1,64 (0,71-2,60)	1,82 (0,87-2,86)	1,41 (1,17-2,26)	0,490
HIF1- α	1,21 (0,60-2,36)	1,32 (1,14-1,65)	1,73 (1,61-2,05)	0,400	1,46 (1,08-2,84)	1,43 (1,10-1,81)	1,74 (1,51-2,18)	0,459
IL-6	1,05 (0,71-1,66)	4,87 (0,77-11,65)	67,92 (30,10-93,95) ^{BH}	<0,001	2,28 (0,33-8,46)	2,50 (1,82-11,01)	47,66 (32,69-135,39) ^{BH}	0,023
IRS1	1,07 (0,62-2,10)	1,99 (0,95-2,24)	1,25 (0,96-1,69)	0,473	1,51 (0,87-1,96)	0,80 (0,66-2,17)	0,67 (0,57-1,40) ^S	0,186
MIF	1,08 (0,60-1,65)	1,07 (0,89-2,60)	1,60 (1,44-2,41)	0,145	1,54 (0,95-2,16)	1,53 (0,77-2,94)	1,71 (1,27-4,23)	0,232
MCP-1	1,06 (0,65-1,42)	1,38 (0,61-1,79)	3,78 (2,22-8,07) ^{BH}	0,007	2,16 (0,40-3,21)	0,70 (0,57-1,47)	5,79 (3,31-8,00) ^{BH}	0,001

Výsledky jsou uváděny jako medián (interkvartilové rozpětí). Statistická významnost byla dle normality dat hodnocena na základě jednocestné analýzy rozptylu pro závislé výběry nebo její neparametrické verze a výsledky post-hoc testů jsou zobrazeny jako: ^B p < 0,05 vs. bazální odběr, ^H p < 0,05 vs. konec hypotermie, ^S p < 0,05 vs. subkutánní adipocyty.

8.2. Plazmatická koncentrace a mRNA exprese clusterinu v podkožní tukové tkáni u pacientů s obezitou a diabetes mellitus 2. typu: vliv krátkodobé hyperinzulinémie, nízkokalorické diety a bariatrické operace

Výsledky této práce byly v roce 2016 publikovány v časopise *Physiological Research*. Plný text článku v otištěné verzi je uveden v příloze.

Pro vytipování nových faktorů, jejichž množství se liší v podkožní tukové tkáni, bylo stanoveno množství 35 vybraných proteinů pomocí nízkodenzitní proteinové arraye. Vzhledem k tomu, že se jednalo o pilotní studii, byl z každé porovnávané skupiny použit vzorek pouze 1 pacienta, a proto nebylo možné data statisticky vyhodnotit. Síla signálu jednotlivých



proteinů byla korigována na pozitivní kontrolu. Pro další zkoumání byl vybrán clusterin, jehož množství bylo ve vzorku SAT od obézní pacientky 9,92 krát vyšší, u obézní pacientky s DM2 před VLCD 1,85 krát nižší a po VLCD 1,36 krát vyšší než ve vzorku od zdravé štíhlé ženy (obrázek 8).

Obrázek: 8 Rozdíl v množství clusterinu ve vzorku podkožní tukové tkáně zdravé štíhlé kontrolní probandky (C) a obézní pacientky (OB).

Stanoveno pomocí nízkodenzitní proteinové arraye.

8.2.1. Nízkokalorická dieta

Antropometrické, biochemické a hormonální charakteristiky kontrolní skupiny, obézních pacientek bez (OB skupina) a s diabetes mellitus 2. typu (DM2 skupina) před a po 2 týdnech VLCD jsou shrnuty v tabulce 6. Dle očekávání bylo BMI, množství tělesného tuku, obvod pasu, HOMA-IR index, sérové koncentrace inzulinu, CRP a leptinu bazálně vyšší u OB i DM2 skupiny oproti zdravým štíhlým ženám (kontrolní skupina). Glykémie na lačno, glykovaný hemoglobin a triglyceridy byly vyšší a HDL cholesterol nižší pouze u DM2, ale ne OB v porovnání s kontrolní skupinou.

Dva týdny VLCD vedly k poklesu BMI, obvodu pasu, HDL a celkového cholesterolu u OB i DM2 skupiny. Množství tělesného tuku, koncentrace CRP a leptinu významně poklesla vlivem VLCD jen u OB skupiny a LDL cholesterol pouze u DM2 skupiny. Glykémie na lačno, triglyceridy a inzulin nebyly ani u jedné ze skupin VLCD ovlivněny. mRNA exprese leptinu se mezi skupinami bazálně nelišila a nebyla ovlivněna 2 týdenní VLCD (obrázek 9).

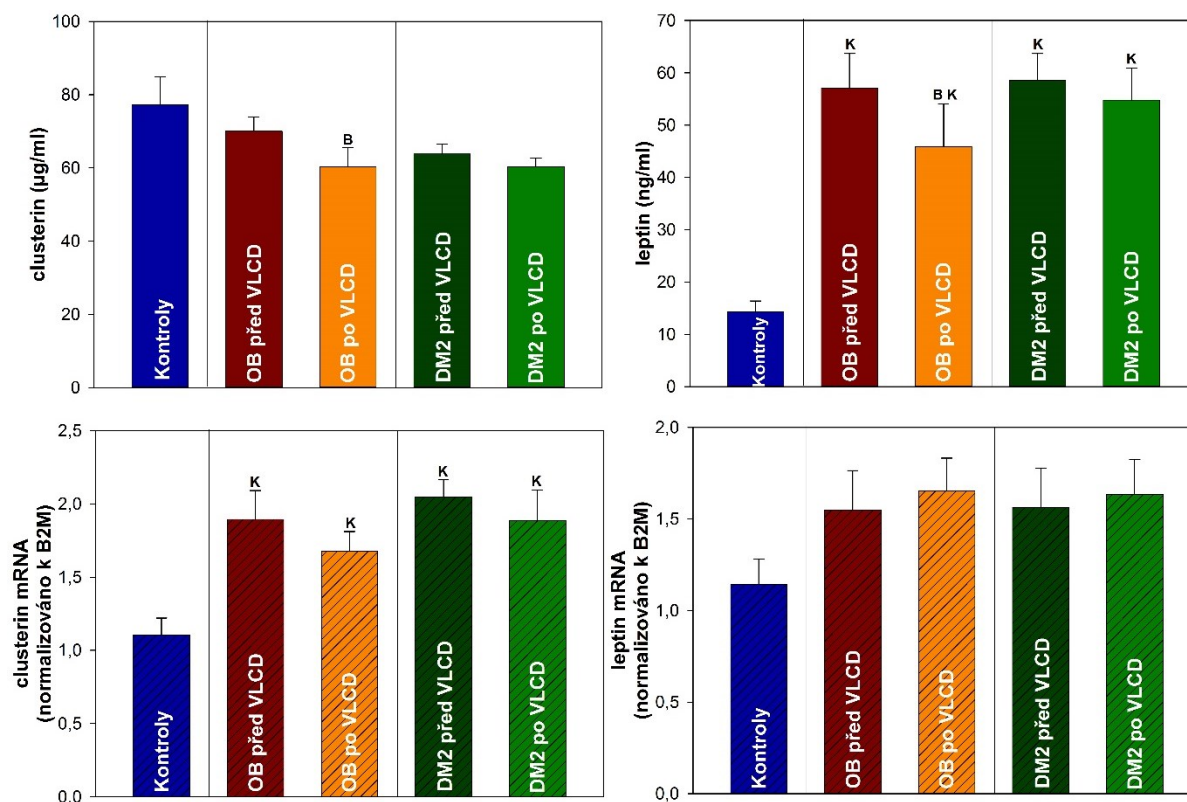
Plazmatické hladiny clusterinu se bazálně mezi OB, DM2 a kontrolní skupinou nelišily (kontrolní skupina: $77,2 \pm 7,7$ $\mu\text{g/ml}$ vs. OB: $70,0 \pm 3,9$ $\mu\text{g/ml}$ vs. DM2: $63,8 \pm 2,8$ $\mu\text{g/ml}$; $p = 0,176$). Dva týdny VLCD vedly k poklesu clusterinu pouze u OB skupiny ($70,0 \pm 3,9$ $\mu\text{g/ml}$ vs $60,3 \pm 5,2$ $\mu\text{g/ml}$; $p = 0,007$), ale ne u DM2 skupiny ($63,8 \pm 2,8$ $\mu\text{g/ml}$ vs. $60,4 \pm 2,3$ $\mu\text{g/ml}$; $p = 0,324$). mRNA exprese clusterinu byla bazálně vyšší u OB i DM2 skupiny a zůstala signifikantně zvýšena i po VLCD (kontrolní skupina: $1,103 \pm 0,118$, vs. OB před: $1,894 \pm 0,197$ a po: $1,676 \pm 0,136$ VLCD vs. DM2 před: $2,046 \pm 0,118$ a po VLCD: $1,888 \pm 0,206$; NS). Nenalezli jsme významné rozdíly mezi plazmatickými hladinami ani mRNA expresí clusterinu mezi OB a DM2 skupinou (obrázek 9).

U podskupiny (10 pacientů ve všech skupinách) pacientů byla navíc stanovena mRNA exprese glypicanu 4, netrinu1 a chemerinu. Netrin 1 se bazálně nelišil mezi skupinami a ani nedošlo k významné změně jeho mRNA exprese vlivem VLCD. Exprese glypicanu 4 se mezi skupinami bazálně nelišila. Vlivem VLCD došlo k významnému nárůstu u DM2, ale ne u OB skupiny. mRNA exprese chemerinu byla signifikantně nižší u OB i DM2 pacientů oproti kontrolní skupině a zůstala významně nižší i po VLCD. Mezi OB a DM2 skupinou nebyl významný rozdíl. Vlivem VLCD nedošlo k signifikantní změně exprese ani u jedné ze sledovaných skupin (obrázek 10).

Tabulka 6: Antropometrické, biochemické a hormonální charakteristiky u kontrolní skupiny, obézních pacientek bez a s diabetes mellitus 2. typu – vliv VLCD.

	Kontrolní skupina	OB před VLCD	OB po VLCD	DM2 před VLCD	DM2 po VLCD
Počet subjektů (ženy/muži)	15 (15/0)	15 (15/0)	11 (11/0)	15 (15/0)	15 (15/0)
Věk (roky)	49,3 ± 1,7	50,2 ± 2,6	NA	55,8 ± 1,6	NA
BMI (kg/m ²)	23,9 ± 0,6	51,6 ± 2,5 ^K	49,4 ± 2,5 ^{KB}	52,0 ± 2,6 ^K	49,4 ± 2,4 ^{KB}
Tělesný tuk (kg)	20,8 ± 1,6	80,0 ± 6,4 ^K	74,8 ± 6,1 ^{KB}	74,3 ± 5,7 ^K	69,5 ± 5,0 ^{KB}
Obvod pasu (cm)	79,0 ± 2,4	131,6 ± 4,1 ^K	127,8 ± 4,3 ^{KB}	135,0 ± 4,5 ^K	130,1 ± 4,4 ^{KB}
Glykémie na lačno (mmol·l ⁻¹)	4,82 ± 0,09	5,19 ± 0,26	4,69 ± 0,14	9,65 ± 1,09 ^{KO}	7,84 ± 0,66 ^{KO}
Glykovaný hemoglobin (% IFCC)	3,78 ± 0,08	4,27 ± 0,16	NA	7,77 ± 0,69 ^{KO}	NA
Celkový cholesterol (mmol·l ⁻¹)	5,39 ± 0,28	5,26 ± 0,40	4,21 ± 0,39 ^{KB}	4,77 ± 0,37	3,77 ± 0,22 ^{KB}
HDL cholesterol (mmol·l ⁻¹)	1,58 ± 0,07	1,37 ± 0,11	1,17 ± 0,14 ^{KB}	1,12 ± 0,06 ^K	0,95 ± 0,04 ^{KB}
LDL cholesterol (mmol·l ⁻¹)	3,31 ± 0,21	3,14 ± 0,29	2,49 ± 0,29 ^K	2,72 ± 0,31	1,99 ± 0,20 ^{KB}
Triglyceridy (mmol·l ⁻¹)	1,10 ± 0,16	1,66 ± 0,27	1,23 ± 0,22	2,22 ± 0,34 ^K	1,86 ± 0,19 ^{KO}
Inzulín (μIU·ml ⁻¹)	15,8 ± 0,7	43,6 ± 7,4 ^K	34,9 ± 5,1 ^K	53,6 ± 11,3 ^K	44,3 ± 4,7 ^K
HOMA-IR index	3,39 ± 0,18	11,01 ± 2,40 ^K	7,97 ± 1,39	22,93 ± 4,70 ^{KO}	14,27 ± 1,40 ^{KO}
C-reaktivní protein (mg·l ⁻¹)	0,194 ± 0,056	2,141 ± 0,550 ^K	1,911 ± 0,584 ^{KB}	2,497 ± 0,361 ^K	1,775 ± 0,294 ^K

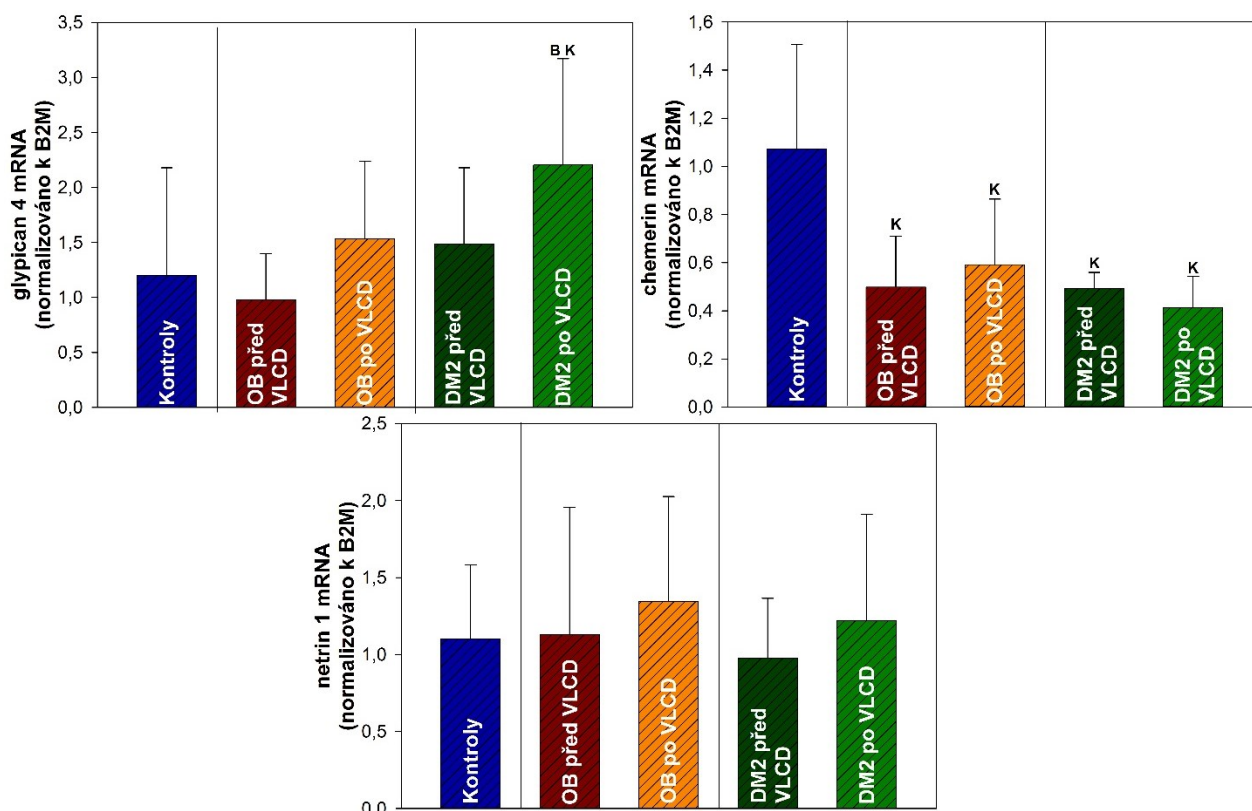
BMI - index tělesné hmotnosti, DM2 – skupina obézních pacientek s diabetes mellitus 2. typu, HOMA-IR - Homeostasis model assessment - insulin resistance, OB – skupina obézních pacientek, VLCD – nízkokalorická dieta. Výsledky jsou uváděny jako průměr ± standartní chyba průměru. Statistická významnost byla hodnocena na základě jednocestné analýzy rozptylu pro nezávislé výběry vs. kontrolní skupina a párového t-testu, nebo jejich neparametrických verzí dle normality dat. ^K p < 0,05 vs. kontrolní skupina; ^O p < 0,05 vs. obézní pacienti, ^B p < 0,05 vs. před VLCD.



Obrázek 9: Plazmatické hladiny a mRNA exprese clusterinu a leptinu u kontrolní skupiny, obézních pacientek bez a s diabetes mellitus 2. typu – vliv VLCD.

B2M – beta-2-mikroglobulin, DM2 – skupina obézních pacientek s diabetes mellitus 2. typu, OB - skupina obézních pacientek, VLCD – nízkokalorická dieta.

Výsledky jsou uváděny jako průměr ± standardní chyba průměru. Statistická významnost byla hodnocena na základě jednocestné analýzy rozptylu pro nezávislé výběry vs kontrolní skupina a párového t-testu, nebo jejich neparametrických verzí dle normality dat. ^K p < 0,05 vs. kontrolní skupina; ^B p < 0,05 vs. před VLCD.



Obrázek 10: mRNA exprese glypicanu 4, chemerinu a netrinu 1 u kontrolní skupiny, obézních pacientek bez a s diabetes mellitus 2. typu – vliv VLCD.

B2M – beta-2-mikroglobulin, DM2 – skupina obézních pacientek s diabetes mellitus 2. typu, OB – skupina obézních pacientek, VLCD – nízkokalorická dieta. n = 10

Výsledky jsou uváděny jako průměr ± standardní chyba průměru. Statistická významnost byla hodnocena na základě jednocestné analýzy rozptylu pro nezávislé výběry vs. kontrolní skupina a párového t-testu, nebo jejich neparametrických verzí dle normality dat. ^Kp < 0,05 vs. kontrolní skupina; ^Bp < 0,05 vs. před VLCD.

8.2.2. Sleeve gastrektomie

Antropometrické, biochemické a hormonální charakteristiky a mRNA exprese zdravých štíhlých žen (kontrolní skupina) a obézních pacientek bez DM2 (OB skupina) před a 6 a 12 měsíců po laparoskopické sleeve gastrektomii (LSG) jsou shrnuty v tabulce 7. Před LSG bylo u obézních pacientek oproti kontrolní skupině významně vyšší BMI, množství tělesného tuku, obvod pasu, HOMA-IR index a hladiny HDL cholesterolu, inzulinu, CRP a leptinu. Obézní pacientky byly mladší než kontrolní skupina.

Šest měsíců po LSG došlo k poklesu BMI, obvodu pasu, CRP a leptinu. Tyto hodnoty zůstaly významně snižené i 12 měsíců po LSG, kdy navíc došlo k poklesu triglyceridů a nárůstu HDL cholesterolu. Plazmatické hladiny clusterinu se nelišily mezi kontrolní skupinou a obézními pacientkami a nebyly ovlivněny LSG (kontrolní skupina: $77,2 \pm 7,7$ µg/ml vs OB před LSG: $75,6 \pm 7,3$ µg/ml vs. OB 6m po LSG: $71,8 \pm 6,6$ µg/ml vs. OB 12m po LSG: $71,4 \pm 5,7$ µg/ml; NS) (obrázek 11).

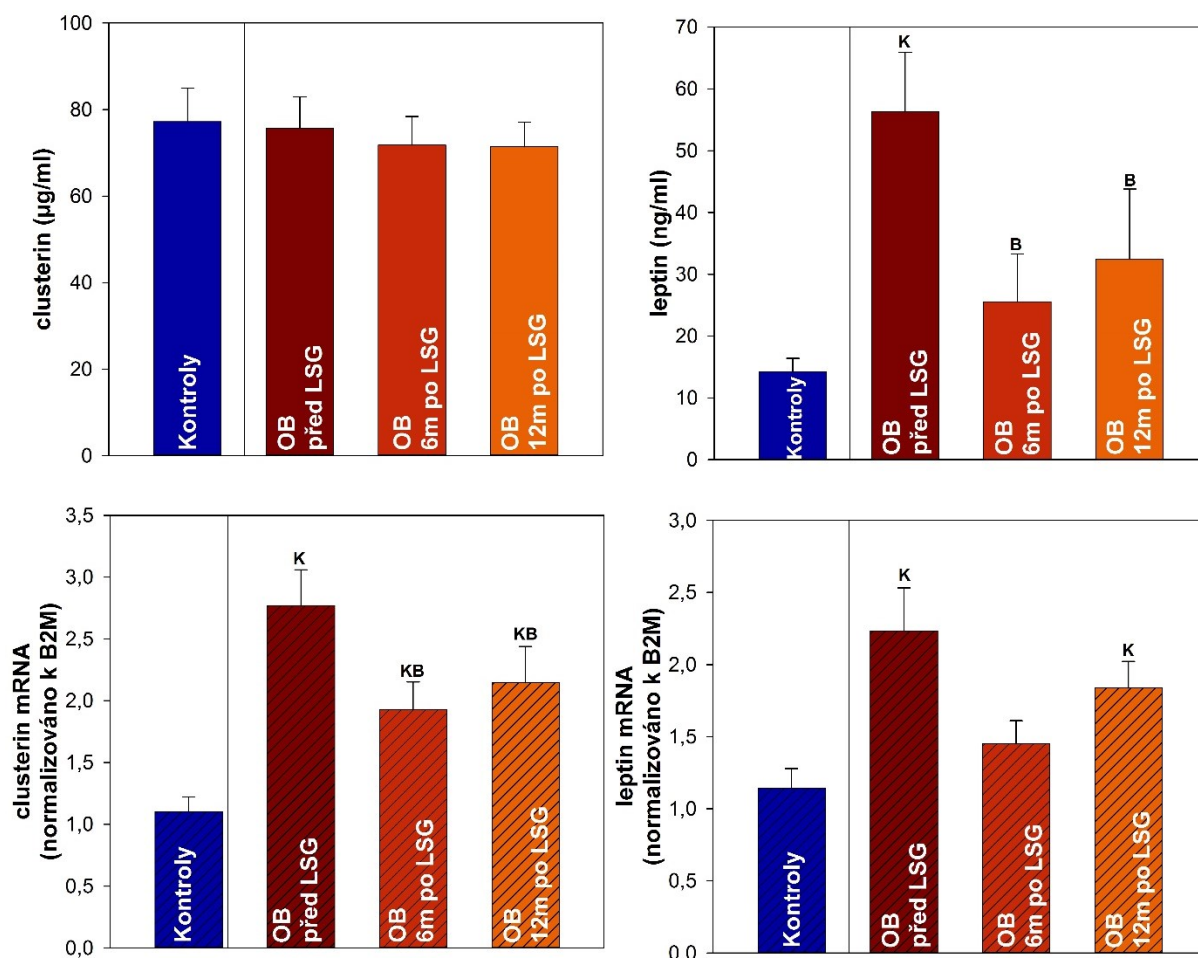
mRNA exprese leptinu i clusterinu byly bazálně významně vyšší u obézních pacientek oproti kontrolní skupině. mRNA exprese clusterinu zůstala zvýšena 6 i 12 měsíců po LSG (kontrolní skupina: $1,103 \pm 0,118$ vs OB před LSG: $2,771 \pm 0,288$ $p < 0,05$, OB 6m po LSG: $1,930 \pm 0,222$ $p < 0,05$; OB 12m po LSG: $2,145 \pm 0,294$; $p < 0,05$). mRNA exprese leptinu poklesla 6 měsíců po LSG na hodnoty srovnatelné s kontrolní skupinou, ale 12 měsíců po LSG došlo opět k významnému nárůstu (obrázek 11).

Tabulka 7: Antropometrické, biochemické a hormonální charakteristiky kontrolní skupiny a obézních pacientek – vliv laparoskopické sleeve gastrektomie.

	Kontrolní skupina	OB před LSG	OB 6m po LSG	OB 12m po LSG
Počet subjektů (ženy/muži)	15 (15/0)	10 (10/0)	10 (10/0)	10 (10/0)
Věk (roky)	$49,3 \pm 1,7$	$40,6 \pm 2,6^K$	NA	NA
BMI ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-2}$)	$23,9 \pm 0,6$	$43,3 \pm 2,7^K$	$33,4 \pm 1,9^{KB}$	$32,9 \pm 2,5^{KB}$
Tělesný tuk (kg)	$20,8 \pm 1,6$	$60,5 \pm 7,2^K$	$39,4 \pm 4,5^{KB}$	$38,8 \pm 5,9^{KB}$
Obvod pasu (cm)	$79,0 \pm 2,4$	$118,4 \pm 4,6^K$	$98,1 \pm 3,7^{KB}$	$97,1 \pm 5,2^{KB}$
Glykémie na lačno ($\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$)	$4,82 \pm 0,09$	$4,97 \pm 0,22$	$4,82 \pm 0,13$	$4,86 \pm 0,12$
Glykovaný hemoglobin (% IFCC)	$3,78 \pm 0,08$	$3,91 \pm 0,22$	$3,83 \pm 0,16$	$3,60 \pm 0,12$
Celkový cholesterol ($\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$)	$5,39 \pm 0,28$	$5,22 \pm 0,31$	$5,12 \pm 0,33$	$5,04 \pm 0,49$
HDL cholesterol ($\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$)	$1,58 \pm 0,07$	$1,26 \pm 0,13^K$	$1,37 \pm 0,13^K$	$1,53 \pm 0,19^B$
LDL cholesterol ($\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$)	$3,31 \pm 0,21$	$3,33 \pm 0,30$	$3,16 \pm 0,28$	$3,10 \pm 0,37$
Triglyceridy ($\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$)	$1,10 \pm 0,16$	$1,53 \pm 0,15$	$1,31 \pm 0,12$	$1,10 \pm 0,12^B$
Inzulín ($\mu\text{IU} \cdot \text{ml}^{-1}$)	$15,8 \pm 0,7$	$31,6 \pm 5,3^K$	$23,2 \pm 3,3$	$23,1 \pm 4,3$
HOMA-IR index	$3,39 \pm 0,18$	$7,25 \pm 1,50^K$	$5,01 \pm 0,72$	$4,94 \pm 0,80$
C-reaktivní protein ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$)	$0,194 \pm 0,056$	$0,923 \pm 0,162^K$	$0,613 \pm 0,126^{KB}$	$0,499 \pm 0,168^{BA}$

BMI - index tělesné hmotnosti, HOMA-IR - Homeostasis model assessment - insulin resistance, OB – skupina obézních pacientek, LSG – laparoskopická sleeve gastrektomie.

Statistická významnost byla hodnocena na základě jednocestné analýzy rozptylu pro závislé a nezávislé výběry vs. kontrolní skupina nebo jejich neparametrických verzí dle normality dat. ^K $p < 0,05$ vs. kontrolní skupina; ^B $p < 0,05$ vs. obézní pacienti před LSG; ^A $p < 0,05$ vs. obézní pacienti 6 měsíců po LSG.



Obrázek 11: Plazmatické hladiny a mRNA exprese clusterinu a leptinu u kontrolní skupiny a obézních pacientek – vliv laparoskopické sleeve gastrektomie.

B2M – beta-2-mikroglobulin, OB – skupina obézních pacientek, LSG – laparoskopická sleeve gastrektomie.

Výsledky jsou uváděny jako průměr ± standardní chyba průměru. Statistická významnost byla hodnocena na základě jednocestné analýzy rozptylu pro závislé a nezávislé výběry vs kontrolní skupina nebo jejich neparametrických verzí dle normality dat. ^K $p < 0,05$ vs. kontrolní skupina; ^B $p < 0,05$ vs. obézní pacienti před LSG

8.2.3. Hyperinzulinemický euglykemický clamp

Antropometrické, biochemické a hormonální charakteristiky pacientů, kteří podstoupili hyperinzulinemický euglykemický clamp (HEC) jsou shrnuty v tabulce 8. Plazmatické hladiny clusterinu a leptinu a jejich mRNA exprese jsou shrnuty na obrázku 12. V kombinované skupině všech pacientů jsme nezjistili rozdíly v bazálních plazmatických hladinách clusterinu v závislosti na pohlaví ($52,3 \pm 3,4 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ muži vs. $47,0 \pm 3,9 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ ženy; $p = 0,322$). Bazální plazmatické hladiny clusterinu se nelišily mezi skupinami (NGT: $41,1 \pm 3,0 \text{ µg/ml}$ vs. $54,0 \pm 2,9 \text{ IGT: µg/ml}$ vs. $53,9 \pm 5,8 \text{ DM2: µg/ml}$; $p = 0,057$).

V porovnání s normoglykemickými probandy (NGT skupina), měly skupiny pacientů s porušenou glukózovou tolerancí (IGT) a diabetes mellitus 2. typu (DM2) vyšší glykémii na lačno a HOMA-IR index a byly mírně starší. Navíc DM2 skupina měla vyšší glykovaný

hemoglobin a HOMA-IR index a nižší celkový cholesterol v porovnání s IGT. HDL cholesterol pak měla oproti NGT i IGT naopak zvýšený.

mRNA exprese clusterinu ani leptinu se bazálně mezi skupinami nelišily. Na konci HEC došlo k významnému nárůstu mRNA exprese clusterinu oproti bazální hodnotě u NGT ($1,760 \pm 0,200$ vs. $2,041 \pm 0,256$; $p = 0,012$), ale ne IGT ($1,591 \pm 0,136$ vs. $1,845 \pm 0,224$; $p = 0,101$) a DM2 skupiny ($1,696 \pm 0,141$ vs. $1,921 \pm 0,164$; $p = 0,194$). mRNA exprese leptinu vlivem HEC významně stoupla pouze u IGT skupiny (obrázek 12).

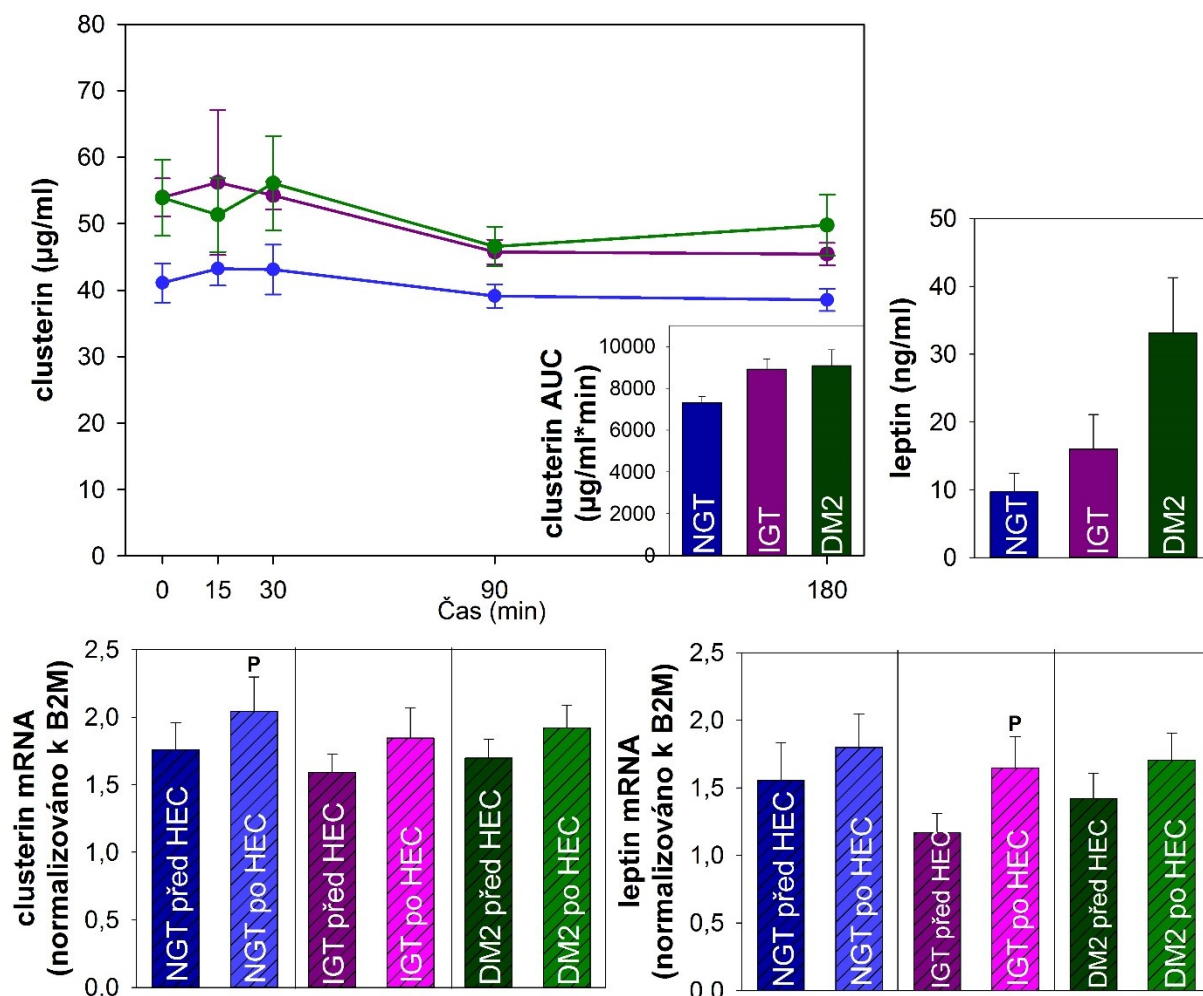
Oproti předpokladům jsme nenašli statisticky významnou korelaci mezi indexem inzulínové senzitivity a bazální mRNA expresí clusterinu ($R = -0,173$; $p = 0,414$), bazální plazmatickou koncentrací clusterinu ($R = -0,260$; $p = 0,217$) ani plochou pod křivkou plazmatického clusterinu během HEC ($R = -0,295$; $p = 0,160$).

Tabulka 8: Antropometrické, biochemické a hormonální charakteristiky pacientů, kteří podstoupili hyperinzulinemický euglykemický clamp.

	NGT	IGT	DM2
Počet subjektů (ženy/muži)	8 (4/4)	8 (4/4)	8 (4/4)
Věk (roky)	$55,0 \pm 1,5$	$60,1 \pm 1,8^N$	$60,8 \pm 1,1^N$
BMI ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-2}$)	$28,6 \pm 1,4$	$29,8 \pm 1,0$	$29,7 \pm 1,3$
Tělesný tuk (kg)	$25,1 \pm 4,1$	$27,3 \pm 2,9$	$30,3 \pm 3,2$
Obvod pasu (cm)	$91,1 \pm 4,5$	$99,8 \pm 2,6$	$102,8 \pm 3,1$
Glykémie na lačno ($\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$)	$4,91 \pm 0,17$	$5,92 \pm 0,24^N$	$7,08 \pm 0,36^{NI}$
Glykovaný hemoglobin (% IFCC)	$4,06 \pm 0,13$	$4,31 \pm 0,10$	$4,79 \pm 0,14^N$
Celkový cholesterol ($\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$)	$5,30 \pm 0,31$	$5,62 \pm 0,36$	$4,42 \pm 0,27^I$
HDL cholesterol ($\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$)	$1,64 \pm 0,15$	$1,57 \pm 0,10$	$1,12 \pm 0,12^{NI}$
LDL cholesterol ($\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$)	$3,22 \pm 0,19$	$3,33 \pm 0,28$	$2,61 \pm 0,12$
Triglyceridy ($\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$)	$0,99 \pm 0,08$	$2,01 \pm 0,56$	$2,20 \pm 0,56$
Inzulín ($\mu\text{IU} \cdot \text{ml}^{-1}$)	$13,4 \pm 1,7$	$27,2 \pm 4,8$	$31,3 \pm 7,1$
HOMA-IR index	$2,97 \pm 0,48$	$6,84 \pm 0,88^N$	$9,34 \pm 2,66^N$
C-reaktivní protein ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$)	$0,690 \pm 0,337$	$1,148 \pm 0,265$	$1,212 \pm 0,523$
Index inzulínové senzitivity ($\text{ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{IU}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$)	$0,022 \pm 0,003$	$0,015 \pm 0,002$	$0,009 \pm 0,002^N$

BMI - index tělesné hmotnosti, DM2 – skupina s diabetes mellitus 2. typu, HEC - hyperinzulinemický euglykemický clamp, HOMA-IR - Homeostasis model assessment - insulin resistance, IGT – skupina s porušenou glukózovou tolerancí, NGT – normoglykemická skupina.

Výsledky jsou uváděny jako průměr \pm standartní chyba průměru. Statistická významnost byla hodnocena na základě jednocestné analýzy rozptylu pro nezávislé výběry a párového t-testu, nebo jejich neparametrických verzí dle normality dat. ^N $p < 0,05$ vs. NGT; ^I $p < 0,05$ vs. IGT, ^P $p < 0,05$ vs. před HEC.



Obrázek 12: Plazmatické hladiny a mRNA exprese clusterinu a leptinu u pacientů, kteří podstoupili hyperinzulinemický euglykemický clamp.

B2M – beta-2-mikroglobulin, DM – skupina s DM2, HEC - hyperinzulinemický euglykemický clamp. IGT – skupina s porušenou glukózovou tolerancí, NGT – normoglykemická skupina.

Plazmatické hladiny leptinu byly měřeny pouze bazálně, hladiny clusterinu byly měřeny během HEC a jsou vyjádřeny i jako plocha pod křivkou (AUC). mRNA exprese clusterinu i leptinu byla v tukové tkáni stanovena 30 min před a těsně po skončení HEC.

Výsledky jsou uváděny jako průměr ± standardní chyba průměru. Statistická významnost byla hodnocena na základě jednocestné analýzy rozptylu pro nezávislé výběry a párového t-testu, nebo jejich neparametrických verzí dle normality dat. ^P p < 0,05 vs. před HEC.

8.2.4. Vztah clusterinu a dalších zkoumaných parametrů

Vztah plazmatických hladin clusterinu a jeho mRNA exprese v podkožní tukové tkáni k vybraným antropometrickým, biochemickým a hormonálním parametrům byl vypočítán bazálně v kombinované populaci všech pacientů zkoumaných v této studii a také v kombinované populaci skládající se pouze ze subjektů s normální glukózovou tolerancí, tedy zdravých štíhlých probandů (kontrolní skupina) a zdravých obézních pacientů. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 9.

Plazmatické hladiny clusterinu korelovaly pozitivně s BMI, množstvím tělesného tuku a leptinem a inverzně s věkem v kombinované skupině všech subjektů, ale ne ve skupině

subjektů s normální glukózovou tolerancí. Pozitivní závislost mezi plazmatickým clusterinem a inzulinem jsme našli naopak pouze ve skupině subjektů s normální glukózovou tolerancí.

V obou kombinovaných skupinách korelovala mRNA exprese clusterinu pozitivně s BMI, množstvím tělesného tuku, obvodem pasu, HOMA-IR indexem, a hladinami triglyceridů, inzulinu na lačno, C-reaktivního proteinu, leptinu i mRNA leptinu v SAT.

Nenašli jsme statisticky významný vztah mezi plazmatickými hladinami clusterinu a leptinu ani mezi plazmatickým clusterinem a jeho mRNA expresí v SAT.

Dle mnohonásobné lineární regrese není žádný ze zkoumaných parametrů nezávislým prediktorem plazmatické hladiny clusterinu v kombinované skupině pacientů pouze s normální glukózovou tolerancí. Ve skupině zahrnující všechny studijní subjekty, tedy včetně DM2 a IGT, je nezávislým prediktorem věk s $p = 0,004$ a adjustovaným $R^2 = 0,099$ dle rovnice:

$$\text{Plazmatický clusterin} = 106,166 - (0,770 \cdot \text{věk})$$

mRNA exprese clusterinu v obou kombinovaných skupinách může být predikována z lineární kombinace dvou nezávislých proměnných - mRNA exprese leptinu ($p < 0,001$) a obvodu pasu ($p < 0,001$):

- pro skupinu s normální glukózovou tolerancí - adjustované $R^2 = 0,645$, regresní rovnice:
 $\text{mRNA clusterinu} = -0,634 + (0,013 \cdot \text{obvod pasu}) + (0,668 \cdot \text{mRNA leptinu})$
- pro skupinu včetně DM2 a IGT - adjustované $R^2 = 0,598$, regresní rovnice:
 $\text{mRNA clusterinu} = 0,336 + (0,011 \cdot \text{obvod pasu}) + (0,618 \cdot \text{mRNA leptinu})$

Tabulka 9: Vztah plazmatických hladin clusterinu a jeho mRNA exprese v podkožní tukové tkáni k vybraným antropometrickým, biochemickým a hormonálním parametrům.

	plazmazický clusterin ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)				mRNA clusterin			
	K+NGT+OB n=51		K+NGT+OB+IGT+DM2 n=80		K+NGT+OB n=51		K+NGT+OB+IGT+DM2 n=80	
	R	p	R	p	R	P	R	p
Věk (roky)	-0,200	0,167	-0,287	0,010	-0,263	0,063	-0,193	0,086
BMI ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}$)	0,147	0,314	0,254	0,023	0,455	<0,001	0,473	<0,001
Tělesný tuk (kg)	0,228	0,114	0,284	0,011	0,444	0,001	0,466	<0,001
Obvod pasu (cm)	0,155	0,287	0,216	0,054	0,452	<0,001	0,468	<0,001
Glykémie na lačno ($\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,131	0,369	-0,103	0,363	0,136	0,341	0,121	0,283
Glykovaný hemoglobin (% IFCC)	-0,073	0,624	-0,092	0,422	0,063	0,670	0,161	0,161
Celkový cholesterol ($\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,133	0,361	0,178	0,117	0,036	0,804	0,006	0,957
HDL cholesterol ($\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)	-0,123	0,402	-0,008	0,948	-0,274	0,054	-0,220	0,053
LDL cholesterol ($\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,076	0,608	0,149	0,198	-0,008	0,954	-0,010	0,931
Triglyceridy ($\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,221	0,126	0,150	0,187	0,445	0,001	0,375	<0,001
Inzulín ($\mu\text{IU}\cdot\text{ml}^{-1}$)	0,313	0,046	0,237	0,055	0,515	<0,001	0,443	<0,001
HOMA-IR index	0,303	0,054	0,159	0,203	0,491	<0,001	0,401	<0,001
C-reaktivní protein ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,117	0,441	0,090	0,453	0,410	0,004	0,273	0,021
Sérový leptin ($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$)	0,224	0,138	0,268	0,023	0,561	<0,001	0,543	<0,001
Plazmatický clusterin ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	NA	NA	NA	NA	-0,039	0,798	0,040	0,735
mRNA leptin	-0,133	0,388	0,031	0,796	0,743	<0,001	0,684	<0,001

BMI - index tělesné hmotnosti, DM2 – skupina s diabetes mellitus 2.typu, HOMA-IR - Homeostasis model assessment - insulin resistance, IGT – skupina s porušenou glukózovou tolerancí, K– kontrolní skupina – zdravé štíhlé ženy, NGT – normoglykemická skupina, OB – obézní pacienti bez DM2.

Výsledky jsou uváděny jako průměr \pm standartní chyba průměru. Statistická významnost byla hodnocena na základě Spearmanova korelačního testu – hodnota $p < 0,05$ byla stanovena jako statisticky významná.

9. Diskuze

Inzulínová rezistence a komplikace s ní spojené představují pro pacienty značné zdravotní riziko. Mírný chronický zánět v tukové tkáni je jednou z hlavních etiopatogenetických příčin jejího vzniku. Primární úlohou současného výzkumu tukové tkáně by tak mělo být hlubší porozumění příčinám vzniku tohoto chronického zánětu a také hledání cest, jak mu předcházet anebo jej léčit. V této práci jsme se zaměřili na dvě zdánlivě nesouvisející témata – léčebnou hypotermii a clusterin, faktor produkovaný mimo jiné tukovou tkání. Obě tyto problematiky mají ovšem společného jmenovatele – jedná se o dvě potenciální cesty, jak zánětu v tukové tkáni předcházet.

Operace představují pro organizmus zásadní zátěž. Často jsou doprovázeny akutní systémovou zánětlivou odpovědí, která je považována za jeden z klíčových faktorů vedoucích k zvýšené pooperační morbiditě a mortalitě. Epikardiální tuková tkáň je během operace významným zdrojem prozánětlivých faktorů (Baker *et al.* 2006; Kremen *et al.* 2006; Mazurek *et al.* 2003). Perioperační hypotermie je dlouhodobě využívána jako preventivní prostředek proti vzniku ischemie a s ní souvisejícího zánětu. U pacientů po srdeční zástavě na jednotkách intenzivní péče její využití prokazatelně zlepšuje neurologickou prognózu (Solař 2004; Williams, Spencer 1958; Yenari, Hemmen 2010). Studie na experimentálních zvířatech ukazují její pozitivní účinky při vážných traumatických poraněních spojených s masivním krvácením (Alam *et al.* 2002; Alam *et al.* 2006). Ovšem efektu hypotermie na endokrinní funkci tukové tkáně byla zatím věnována pouze velmi malá pozornost. Naše výsledky ukazují, že hluboká hypotermie má nejen významný vliv na systémovou produkci prozánětlivých cytokinů, ale také v tukové tkáni ovlivňuje mRNA expresi genů souvisejících se zánětem a reakcí na oxidační stres během a po elektivní kardiokirurgické operaci.

Sérové koncentrace cirkulujících zánětlivých markerů měřených v naší studii zůstaly na předoperační úrovni po celou operaci. První významný nárůst byl pozorován až 4 hod (IL-6, IL-8, sTNFRI, sIL-2R), 16 hod (C-reaktivní protein) nebo dokonce až 28 hod (prokalitonin) po konci operace. Tyto výsledky můžeme částečně porovnat s daty z našich předchozích studií Kremen *et al.* z roku 2006 (Kremen *et al.* 2006) a Kotulák *et al.* z roku 2011 (Kotulák *et al.* 2011), do kterých byli zařazeni pacienti, kteří prodělali podobnou elektivní operaci, ale bez hypotermní fáze. Tyto operace navíc trvaly přibližně o třetinu kratší dobu. V průběhu sérových koncentrací vidíme zásadní odlišnosti – především u interleukinu (IL) 6,

cytokinu majícím zásadní vliv na zánětlivou reakci. V obou dřívějších studiích byly koncentrace IL-6 významně zvýšeny již na konci operace, tedy v čase, který přibližně odpovídá konci hypotermie u našich pacientů (Kotulak *et al.* 2011; Kremen *et al.* 2006). Tyto výsledky jsou také v souladu s daty získanými na experimentálních zvířatech. Například Chen *et al.* (Chen *et al.* 2005) na prasečím modelu letálního krvácení ukázal, že nárůst sérového IL-6 byl významně utlumen u hypotermních v porovnání s normotermními zvířaty. V porovnání s výsledky studie Kotuláka *et al.* (Kotulak *et al.* 2011) vidíme podobný rozdíl i v průběhu sérových hladin C-reaktivního proteinu (CRP) a IL-8 – nárůst je podstatně pomalejší u hypotermní operace, i když trvala delší dobu. Oba tyto faktory přitom významně ovlivňují vznik zánětu. CRP je významným markerem vzniku zánětlivé reakce a IL-8 je chemokin podílející se na chemotaxi neutrofilů a jejich aktivaci při akutní zánětlivé odpovědi (Oda *et al.* 1994). To odpovídá dříve publikovaným studiím, které ukázaly pozitivní vliv hypotermie na sérové koncentrace IL-8 (Jenkins *et al.* 2012; Maruna *et al.* 2009). Zdá se tedy, že hluboká hypotermie je schopna oddálit nástup systémové zánětlivé odpovědi na stres, který pro organizmus představuje kardiochirurgická operace. Tuková tkáň je významným producentem systémového IL-6 (Mohamed-Ali *et al.* 1997b). Díky tomu se můžeme domnívat, že změny v jeho hladinách jsou do jisté míry obrazem změn v tukové tkáni.

IL-6 hraje centrální úlohu v rozvoji zánětu. Tuková tkáň významně přispívá k jeho systémovým hladinám (Fried *et al.* 1998; Mohamed-Ali *et al.* 1997a). Dle očekávání byla v naší studii exprese IL-6 u obou skupin vyšší v metabolicky aktivnější epikardiální než v podkožní tukové tkáni. Při porovnání s celkovou tukovou tkání, byla mRNA exprese IL-6 v izolovaných adipocytech významně nižší. To je v souladu s dřívějším zjištěním, že adipocyty produkují jen 5-10 % celkového IL-6 v podkožní i viscerální tukové tkáni (Fain *et al.* 2004; Fried *et al.* 1998). Došlo k významnému nárůstu mRNA exprese IL-6 na konci operace v podkožní i epikardiální tukové tkáni u obou zkoumaných skupin pacientů i v adipocytech izolovaných z obou těchto tukových dep. Přestože hluboká hypotermie zabránila významnému nárůstu mRNA exprese IL-6 během hypotermní fáze, následný nárůst na konci operace byl dokonce vyšší než u kontrolní skupiny. To je překvapivé, vezmeme-li do úvahy průběh sérových koncentrací. Můžeme z toho tedy vyvozovat, že ostatní zdroje IL-6 v organizmu nebyly operací vyvolaným stresem ovlivněny tolik jako tuková tkáň, případně byla produkce IL-6 v nich pomalejší. Vzhledem k tomu, že IL-6 má částečně i protizánětlivý účinek tím, že snižuje expresi některých prozánětlivých cytokinů (Jones *et al.* 2001), můžeme spekulovat, že jeho zvýšená exprese v tukové tkáni na konci operace by naopak mohla být podpořena hypotermií

a mít protektivní úlohu před vznikem zánětu. IL-6 je teoreticky schopen ovlivňovat uvolňování leptinu (Coppack 2001), který má mimo jiné i termogenní efekt (Fischer *et al.* 2016). Je tedy možné, že zvýšení exprese IL-6 by mohlo souviset se snahou organismu navodit přirozenou tělesnou teplotu.

Monocyty přitahující protein 1 (MCP-1) je považován za jeden z klíčových faktorů zodpovědných za vstup monocytů (Kamei *et al.* 2006; Kanda *et al.* 2006), T-lymfocytů (Carr *et al.* 1994) a bazofilů (Bischoff *et al.* 1992) do tukové tkáně a tedy i pro vznik chronického mírného zánětu v této tkáni. V naší studii vykazoval u hypotermní skupiny podobný průběh exprese jako IL-6 bez významné změny na konci hypotermie a následným nárůstem na konci operace v subkutánním i epikardiálním tuku. Podobně jako u IL-6, i u MCP-1 vedla hypotermie ke zpomalení vzestupu exprese v porovnání s kontrolní skupinou. Tyto výsledky nás vedou k domněnce, že hypotermie může potlačovat chemoatrakční schopnost tukové tkáně, což může mít za následek její sníženou infiltraci imunokompetentními buňkami a potlačení zánětu v tukové tkáni. V souladu s předchozími poznatky byl nárůst v mRNA expresi MCP-1 výraznější v celé tukové tkáni než v izolovaných adipocytech. To potvrzuje skutečnost, že hlavním zdrojem MCP-1 v tukové tkáni jsou buňky stromavaskulární frakce (Bruun *et al.* 2005; Dahlman *et al.* 2005). U myši je tuková tkáň hlavním zdrojem MCP-1 (Sartipy, Loskutoff 2003), ovšem u lidí se její význam pro produkci MCP-1 zatím nepotvrdil (Dahlman *et al.* 2005). Můžeme se tedy jen domnívat, že zpomalení nárůstu jeho exprese v tukové tkáni vlivem hypotermie stejně pozitivně ovlivní i cirkulující hladiny tohoto zánětlivého chemokinu.

mRNA exprese TNF- α byla na konci operace významně zvýšena v epikardiálním, ale ne v subkutánním tuku u hypotermní i kontrolní skupiny. To opět potvrzuje roli epikardiální tukové tkáně jako metabolicky a sekrečně aktivnějšího tukového depa (Dusserre *et al.* 2000). Vzhledem k tomu, že TNF- α v tukové tkáni zvyšuje mRNA expresi IL-6 v tuku (Coppack 2001), je tento výsledek zcela v souladu s výše popsány výsledky pro IL-6. Adipocyty se na expresi TNF- α podílejí pouze minimálně (Fain *et al.* 2004). To vysvětluje skutečnost, že se nám jeho expresi nepodařilo v adipocytech dostatečně detekovat.

Faktor inhibující migraci makrofágů (MIF), poslední prozánětlivý cytokin stanovený v naší studii, nevykazoval v žádném ze zkoumaných typů vzorků od hypotermní skupiny významné změny. U kontrolní skupiny dokonce jeho exprese na konci operace mírně poklesla. MIF je v tukové tkáni exprimován převážně stromavaskulární frakcí (Fain 2006). A jeho exprese je indukována hlavně TNF- α , se kterým se vzájemně potencují pomocí pozitivní

zpětnovazebné reakce (Calandra *et al.* 1994). U oběžných by úlohou MIF v tukové tkáni mohla být akumulace makrofágů (Skurk *et al.* 2005). Vzhledem k tomu, že jsme v naší studii nezaznamenali jeho změny, nemá pravděpodobně významnou roli při vzniku operací indukované zánětlivé reakce v tukové tkáni. Navíc jeho exprese v tukové tkáni pravděpodobně významně nepřispívá k systémovým hladinám (Tam *et al.* 2012), což ještě čeká na ověření pomocí dalšího výzkumu.

Jak bylo popsáno výše, tuková tkáň významně přispívá k operací-indukovanému systémovému zánětu (Baker *et al.* 2006; Mazurek *et al.* 2003). Proto byl jedním z nejzajímavějších výsledků naší studie výše popsáný fakt, že žádný z genů spojených se zánětlivou reakcí a oxidačním stresem nevykazoval významné změny v mRNA expresi během hypotermní fáze, která trvala přibližně 4,5 hod od začátku operace (schéma hypotermní operace je znázorněno na obrázku 4). V kontrastu s tím u kontrolní skupiny pacientů, kteří podstoupili operaci bez hypotermní fáze, došlo k významnému nárůstu pěti z devíti zkoumaných genů (IL-6, MCP-1, TNF- α , MIF, HIF1- α) již během 4,5 hod trvající operace. Analogicky i ve studii Křemena *et al.* (Kremen *et al.* 2006) byla zvýšena mRNA exprese IL-6, TNF- α a MCP-1 již na konci 4 hodinové kardiochirurgické operace bez hypotermní fáze, a to jak v subkutánní, tak viscerální tukové tkáni. Tyto hodnoty odpovídají i průběhu cirkulujících zánětlivých parametrů. Navíc nárůst mRNA exprese MIF byl sice významně vyšší, ale HIF-1 α a MCP-1 v epikardiální tukové tkáni byl dokonce významně nižší na konci hypotermní fáze v porovnání s koncem operace u kontrolní skupiny. Na konci hypotermní operace pak byl nárůst HIF1- α v podkožní tukové tkáni a IL-6 a MCP-1 v podkožní i epikardiální tukové tkáni významně vyšší na konci hypotermní oproti klasické operaci. Ovšem musíme vzít v úvahu, že hypotermní operace trvala přibližně 1,6 krát déle než kontrolní operace. Jak bylo prokázáno dříve, změna sérových hladin IL-6 pozitivně koreluje s délkou operace (Ohzato *et al.* 1992) a můžeme se domnívat, že podobná závislost bude platit i pro ostatní zánětlivé parametry, protože s délkou operace se prohlubuje stres, kterému je organizmus vystaven. Z našich výsledků tedy vyplývá, že hluboká hypotermie během operace snižuje nebo alespoň zpožďuje nástup operací vyvolané systémové zánětlivé odpovědi. Na tomto pozitivním efektu léčebné hypotermie se z části podílí i ovlivnění mRNA exprese genů spojených se zánětlivou reakcí a oxidačním stresem v tukové tkáni, což vede k snížení produkce prozánětlivých markerů tukovou tkání.

Léčebná hypotermie je metoda snižující intenzitu metabolických pochodů v organizmu a díky tomu redukuje pravděpodobnost vzniku ischemie v nedostatečně prokrvených tkáních. Na druhou stranu, při hypotermii klesá zásobení tkání kyslíkem, což aspoň teoreticky

může vést ke vzniku hypoxie. Buňky reagují na snížený parciální tlak kyslíku v tkáních a s ním související stres indukcí změn v mRNA expresi široké škály genů (Semenza 2000). Jedná se především o geny metabolických a zánětlivých drah, ale například i o geny regulující apoptózu. Za hlavní regulátor tkáňové homeostázy kyslíku je považován transkripční faktor HIF1- α . mRNA exprese HIF1- α je v hypoxických podmínkách zvýšena v tukové tkáni obézních pacientů i v *in vitro* experimentech prováděných na tukové tkáni (Canello *et al.* 2005; Hosogai *et al.* 2007). V naší studii nevykazoval HIF1- α významné změny exprese během hypotermní fáze operace, jejíž součástí byla i anoxická fáze. Na konci operace byla jeho exprese významně zvýšena v podkožní, ale ne v epikardiální tukové tkáni a izolovaných adipocytech. U kontrolní skupiny došlo také k nárůstu na konci operace. Při porovnání mRNA expresí z obou typů operací ve stejný čas, byla exprese HIF1- α na konci hypotermie dokonce významně nižší než na konci kontrolní operace. Výsledky HIF1- α jsou dále podpořeny faktem, že mRNA exprese metallothioneinu 3 (MT3) nebyla v našich vzorcích detekovatelná, a to ani na konci operace. Dříve bylo prokázáno, že exprese MT3 v tukové tkáni dramaticky narůstá již 60 minut po začátku hypoxie (Wang *et al.* 2008a).

Dalšími geny, u kterých bylo prokázáno ovlivnění exprese nízkým tlakem kyslíku, jsou glukózový transportér 1 (GLUT1) a inzulin receptor substrát 1 (IRS1) (Kang *et al.* 2007; Wang *et al.* 2007). Změny tkáňového metabolismu díky hypotermii vedou ke zvýšení glykémie díky poklesu utilizace substrátu a snížení uvolňování inzulinu (Hoo-Paris *et al.* 1988). Ovšem ve studii Wood *et al.* (Wood *et al.* 2007) zjistili nárůst exprese GLUT1 jako reakci na dlouhotrvající hypoxii v lidských adipocytech *in vitro*. To ale neodpovídá našim výsledkům, protože v izolovaných adipocytech jsme žádnou změnu exprese nezaznamenali. Domníváme se tedy, že zvýšená mRNA exprese GLUT1 na konci operace představuje spíše adaptační mechanismus sloužící ke zvýšení příjmu glukózy tukovou tkání ve stresovém stavu. V souhrnu tato zjištění ukazují, že hluboká hypotermie během operace působila jako prevence před vznikem hypoxie tukové tkáně během anoxické fáze kardiochirurgické operace. Vzhledem k tomu, že hypoxie tukové tkáně byla v celé řadě studií spojena s nárůstem produkce prozánětlivých faktorů (O'Rourke *et al.* 2011; Ye *et al.* 2007), zamezení jejímu vzniku může alespoň částečně vysvětlit absenci změn v mRNA expresi prozánětlivých faktorů na konci hypotermní fáze u našich pacientů. Navíc vzhledem k tomu, že jsme v izolovaných adipocytech nezjistili žádnou změnu exprese HIF1- α , můžeme předpokládat, že na konci hypotermního období byla hypoxií ovlivněna pouze stromavaskulární frakce tukové tkáně.

Překvapivým zjištěním byla snížená exprese antioxidantního faktoru glutathion peroxidázy 1 (GPX1) na konci operace v epikardiální tukové tkáni u hypotermní skupiny. V ostatních vzorcích ani u kontrolní skupiny přitom nedošlo k žádné změně. To je v rozporu s nálezy v mozku, kde hypotermie zvyšuje expresi GPX1 jako ochranu před volnými kyslíkovými radikály (Lei *et al.* 1994). Spíše je to v souladu s *in vitro* výsledky práce Wanga *et al.* (Wang *et al.* 2008a), podle které dlouhodobá hypoxie vedla k poklesu exprese GPX1 spolu s několika dalšími regulačními geny.

mRNA exprese antiapoptického genu BCL-2 nebyla operací ovlivněna. Operací vyvolaný stres, hluboká hypotermie, ani anoxická fáze během operace tedy zdá se nezvyšují apoptózu v tukové tkáni během operace.

Hlavním limitem naší studie je její observační charakter. Pro aspoň částečně lepší interpretaci dat jsme do studie zařadili i výsledky mRNA exprese u pacientů podstupujících kardiochirurgickou operaci bez hypotermní fáze. Jsme si ovšem vědomi, že porovnání těchto dvou operací je do určité míry limitováno rozdílnou délkou chirurgického výkonu, ale i vstupní diagnózou pacientů. Námi zkoumaný typ operace bohužel nedovoluje provedení case-control design studie s přímým srovnáním stejné operace v provedení s a bez hypotermní fáze. Proto nebylo možné zcela vyloučit ovlivnění našich výsledků faktory, jako jsou medikace, tekutiny nebo parenterální výživa podaná během a pooperačně. I přes tyto limitace věříme, že naše data přinášejí několik možných teorií o mechanismech, jimiž může hypotermie interagovat s tukovou tkání a částečně tak ovlivnit celý organismus. Nicméně, objasnění jejich přesného významu a podrobnější porozumění jejich funkce vyžaduje ještě další výzkum.

Ve druhé části této práce jsme se zabývali faktory produkovanými tukovou tkání, které by se mohly podílet na regulaci zánětu a inzulínové rezistence v tukové tkáni. Zaměřili jsme se primárně na clusterin, protein exprimovaný většinou buněčných typů a vyskytující se ve všech tělních tekutinách (Aronow *et al.* 1993). Clusterinu jsme začali věnovat pozornost na základě výsledků nízkodenzitní proteinové arraye, kde byla jeho hladina v tukové tkáni výrazně zvýšená u obézní pacientky oproti zdravé štíhlé ženě. Z tohoto a údajů dostupných v literatuře jsme došli k předpokladu, že by clusterin mohl mít lokální regulační roli v tukové tkáni a změnách jejího metabolismu při obezitě. Pro ověření této hypotézy jsme měřili jeho mRNA expresi a plazmatickou hladinu u obézních pacientů s a bez DM2. Pro lepší pochopení jeho možné regulační úlohy v tukové tkáni jsme dále zkoumali jeho změny po různých

intervencích. Vzhledem k tomu, že clusterin tvoří v krvi komplexy s významným adipokinem leptinem (Bajari *et al.* 2003), stanovovali jsme také sérové koncentrace a mRNA expresi leptinu.

Informace o vztahu clusterinu s BMI, případně s DM2, jsou v literatuře rozporuplné. V naší studii jsme potvrdili výsledky studií (Arnold *et al.* 2011; Kujiraoka *et al.* 2006; Poulakou *et al.* 2008), ve kterých u různých skupin pacientů nenašli rozdíly v hladinách clusterinu způsobených rozdílným BMI nebo přítomností DM2. Naopak jsou naše data v rozporu s dalšími dvěma pracemi, v nichž byla zjištěna zvýšená plazmatická hladina clusterinu u obézních pacientů s a bez DM2 (Trogakos *et al.* 2002; Won *et al.* 2014). Tyto rozdíly v poznatcích mezi jednotlivými pracemi si vysvětlujeme tím, že má clusterin v organismu celou řadu funkcí, a tudíž bude jeho plazmatická hladina pravděpodobně ovlivněna širokou škálou faktorů. Je proto možné, že rozdílné výsledky studií mohou být do značné míry dány výběrem pacientů, především tím, jakými dalšími komorbiditami trpěli. Vzhledem k tomu, že clusterin je v krvi vázán na apolipoprotein A-I jako součást HDL cholesterolu (James *et al.* 1991; Jenne *et al.* 1991), případně je součástí LDL cholesterolu (Hoofnagle *et al.* 2010; Pettersson *et al.* 2011), nabízí se jako možná příčina různých výsledků těchto studií přítomnost dyslipidémie, která by teoreticky mohla ovlivnit hladinu clusterinu. Dalším možným zdrojem rozdílů je metodika stanovení plazmatických koncentrací clusterinu, protože ne všechny použité kity musí nutně stejným způsobem detekovat vázané formy clusterinu. Z výsledků naší studie tedy vyvozujeme závěr, že clusterin nemá významnou systémovou úlohu v etiopatogenezi metabolických komplikací obezity.

Chybějícím rozdílem v bazálních hladinách clusterinu mezi skupinou s a bez DM2 odpovídá i skutečnost, že jsme nenalezli žádnou korelaci mezi plazmatickým clusterinem a BMI, tělesným tukem a obvodem pasu v kombinované skupině pacientů bez IGT a DM2. To je v souladu s některými předchozími studiemi (Arnold *et al.* 2011; Kujiraoka *et al.* 2006; Poulakou *et al.* 2008), v nichž také nebyl nalezen žádný vztah mezi cirkulujícím clusterinem a BMI.

V našich předchozích studiích jsme ukázali přínosy různých váhových redukcí na metabolický a zánětlivý profil obézních pacientů s i bez DM2. Tento pozitivní efekt je patrný jak u krátkodobých redukcí hmotnosti, jakou je nízkokalorická dieta (VLCD) (Mraz *et al.* 2011; Tousekova *et al.* 2012), tak po postupné dlouhodobé redukci váhy způsobené bariatrickou operací, v našem případě laparoskopickou sleeve gastrektomií (LSG) (Trachta *et al.* 2014;

Urbanova *et al.* 2014). Proto jsme v naší studii zkoumali, zda VLCD a LSG ovlivní plazmatické hladiny clusterinu spolu s jeho mRNA expresí v podkožní tukové tkáni u obézních pacientů s anebo bez DM2. V dostupných studiích vedl váhový pokles způsobený VLCD nebo LSG k nárůstu plazmatické koncentrace clusterinu (Arnold *et al.* 2011; Oberbach *et al.* 2011). Proto bylo velmi překvapivé, že dva týdny po VLCD jsme v naší studii zjistili naopak výrazně sníženou plazmatickou hladinu clusterinu u obézních pacientů. U obézních pacientů s DM2 jsme navíc žádnou statisticky významnou změnu nezaznamenali. LSG nevedlo ke změně plazmatických hladin clusterinu. Důvod, proč došlo k rozdílné reakci na váhový pokles při VLCD u DM a OB pacientů, není jasný. Jedním z možných vysvětlení by mohla být skutečnost, že metabolické změny jsou u obézních pacientů s DM2 výraznější a poměrně krátká doba intervence proto u nich nebyla dostatečná pro vyvolání změny na systémové úrovni (Galgani *et al.* 2008). Vezmeme-li v úvahu, že hladiny clusterinu měly u DM2 pacientů stejný trend jako u nediabetiků, hladiny po intervenci byly u obou skupin srovnatelné, musíme připustit i variantu, že absence jasného efektu VLCD u DM2 pacientů může být dána i relativně malým počtem pacientů ve skupině. Jednoduchá není ani odpověď na otázku, proč v naší studii došlo k snížení hladin clusterinu u OB pacientů, zatímco ve výše zmíněných pracích byly hladiny naopak zvýšeny. Možným vysvětlením by mohla být rozdílná doba VLCD, která byla v naší studii kratší. Můžeme tedy spekulovat o možnosti, že pozitivní vliv váhové redukce se v případě clusterinu dostaví až po delší době. Ovšem chybějící změny v plazmatických hladinách clusterinu po LSG spíše vedou k závěru, že clusterin není přímo regulován redukčními intervencemi, případně, že vůbec nemá významnou roli v modulaci energetické homeostázy.

Clusterin je v krvi částečně vázán jako součást HDL nebo LDL cholesterolu (Hoofnagle *et al.* 2010; James *et al.* 1991; Pettersson *et al.* 2011). Jedna z navrhovaných rolí clusterinu ve vazbě s HDL cholesterolem je jeho pozitivní vliv na aterosklerózu, protože nedostatek clusterinu v HDL částicích zhoršuje kardioprotektivní funkci lipoproteinů (Hoofnagle *et al.* 2010; James *et al.* 1991). Zvýšené množství clusterinu bylo zjištěno v arteriální stěně v průběhu rozvoje aterosklerózy (Trougakos *et al.* 2002). Clusterin v HDL částicích pravděpodobně slouží jako regulátor transportu lipidů a lokální redistribuci lipidů, ale ne jako molekula přímo transportující lipidy (Jenne *et al.* 1991; Trougakos *et al.* 2002). Mezi množstvím clusterinu v HDL a LDL nebo VLDL byla zjištěna silná inverzní korelace (Hoofnagle *et al.* 2010). V naší studii jsme ovšem nenalezli korelaci mezi plazmatickým clusterinem a HDL nebo LDL cholesterolem.

Clusterin také funguje jako regulátor leptinové aktivity skrze tvorbu komplexů s leptinem (Bajari *et al.* 2003), avšak jen malá část plazmatického leptinu je vázána s clusterinem (Arnold *et al.* 2011), a proto je význam těchto komplexů sporný. V naší studii jsme našli pouze slabou asociaci plazmatických hladin clusterinu a leptinu v kombinované populaci všech pacientů, a dokonce žádnou korelaci ve skupině bez pacientů s IGT a DM2. To je v souladu s některými pracemi, podle kterých není mezi těmito dvěma adipokiny žádná závislost nebo je zde dokonce negativní korelace (Arnold *et al.* 2011; Poulakou *et al.* 2008).

Studie zabývající se výzkumem Alzheimerovy choroby ukazují, že clusterin může hrát různě výraznou roli v mozku žen a mužů (Zhao *et al.* 2016). Navíc ve studii Poulakou *et al.* (Poulakou *et al.* 2008) zjistili významně vyšší hladiny clusterinu ve skupině mužů oproti ženám. Proto jsme se v naší studii dále zaměřili také na otázku, zda jsou plazmatické hladiny clusterinu závislé na pohlaví. Nenašli jsme žádné rozdíly mezi pohlavími, což může být vysvětleno relativně nízkým počtem pacientů, případně jejich odlišnými charakteristikami v porovnání s výše zmíněnou studií.

V současné době nejsou kromě našeho článku k dispozici žádné údaje o mRNA expresi clusterinu v lidské tukové tkáni. V naší studii byla exprese clusterinu v podkožní tukové tkáni zvýšená oproti kontrolní skupině u obézních i DM2 pacientů. Zatímco po 2 týdnech trvající VLCD zůstala exprese v obou skupinách významně zvýšená, 6 měsíců po LSG byla mRNA exprese clusterinu o 30 % snížena a dokonce i 12 měsíců po LSG zůstala o 23 % snížena oproti bazálním hodnotám. Došlo tedy k jejich normalizaci. Z toho můžeme usuzovat, že váhový úbytek způsobený VLCD na rozdíl od bariatrické operace nebyl dostatečný na to, aby vyvolal změny v mRNA expresi v tukové tkáni. V jiných tkáních byl clusterin identifikován jako gen, jehož zvýšená exprese může být známkou opravných procesů nebo remodelace poškozené tkáně (Hoofnagle *et al.* 2010; Jenne *et al.* 1991). Jedním z důsledků obezity je zvýšená míra apoptózy a buněčné smrti v tukové tkáni. *In vivo* se zdá být exprese clusterinu spojena s přežitím buněk (Humphreys *et al.* 1999). To nás vede ke spekulaci, že zvýšená mRNA exprese clusterinu v tukové tkáni obézních pacientů může být markerem kompenzačních mechanismů chránících tkáň před apoptózou, jejíž zvýšená míra je pro tukovou tkáň při obezitě typická. Tato teorie je podpořena také mnohonásobným lineárním regresním modelem, v němž vyšly jako prediktory mRNA exprese clusterinu v podkožní tukové tkáni mRNA exprese leptinu spolu s obvodem pasu - tedy dva faktory úzce související s poklesem hmotnosti.

Jedna z navrhovaných rolí clusterinu v organismu je jeho podíl na tlumení zánětu (Kounnas *et al.* 1995), i když důkazy pro tuto teorii nejsou jednoznačné. Clusterin zvyšuje expresi chemotaktických cytokinů MCP-1, MIP-1 β , CCL5 a TNF- α . Clusterin indukuje migraci makrofágů, což je navíc podpořeno právě zvýšenými hladinami chemotaktických cytokinů, především TNF- α (Shim *et al.* 2012). Na druhou stranu bylo zjištěno, že clusterin snižuje expresi TNF- α *in vivo* a clusterin-deficientní myši vykazují zvýšenou infiltraci imunkompetentních buněk do pankreatu během pankreatitidy (Savkovic *et al.* 2007). Navíc zvýšená exprese clusterinu tlumí expresi některých prozánětlivých chemokinů (Kim *et al.* 2009). Clusterin také tlumí vznik autoimunitní myokarditidy a chrání srdeční tkáň před poškozením vlivem zánětu, jak bylo prokázáno na modelu clusterin-deficientní myši (McLaughlin *et al.* 2000). Pokud přijmeme teorii o protizánětlivých účincích clusterinu v některých tkáních, můžeme spekulovat, že působí protizánětlivě i v tukové tkáni. Tato jeho funkce může být dalším vysvětlením pro jeho zvýšenou mRNA expresi v podkožní tukové tkáni obézních pacientů, která je typicky charakterizována chronickým mírným zánětem. Tuto myšlenku podporuje i fakt, že v naší studii mRNA exprese clusterinu v podkožní tukové tkáni obou kombinovaných skupin, tedy včetně i bez IGT a DM2 pacientů, pozitivně korelovala nejen s markery obezity (BMI, tělesný tuk, obvod pasu), ale i se sérovými triglyceridy, hladinami inzulinu na lačno, HOMA-IR indexem a prozánětlivým markerem C-reaktivním proteinem. Chronický mírný zánět u obézních pacientů je jedním z mechanismů přispívajících ke vzniku aterosklerózy, a proto protizánětlivý účinek clusterinu může zároveň sloužit i jako ochrana před vznikem aterosklerózy. Na druhou stranu, skutečnost, že myši s knockoutem genu pro apolipoprotein E se sníženou expresí jaderného clusterinu mají redukované množství aterosklerotických lézí, svědčí spíše proti antiaterogenní roli clusterinu (Hamada *et al.* 2011).

Zatímco mezi množstvím clusterinu v HDL částicích a inzulinovou senzitivitou byla u lidí zjištěna silná pozitivní korelace (Hoofnagle *et al.* 2010), o akutní regulační roli inzulinu a glukózy na změny v mRNA expresi clusterinu je známo jen velmi málo. V primárních hepatocytech a v hepatocytárních buněčných liniích zvyšují vysoké koncentrace glukózy expresi clusterinu (Kim *et al.* 2011a). Myši s knockoutem genu pro clusterin krmené vysokotukovou dietou mají oproti normálním zvířatům při hyperinzulinemickém euglykemickém clampu (HEC) vyšší hladinu inzulinu a snížené vychytávání a produkci glukózy v játrech a díky tomu potřebují i vyšší infuzní rychlost glukózy (Kwon *et al.* 2014). O efektu hladin inzulinu a glukózy na plazmatické hladiny clusterinu a jeho mRNA expresi v lidské tukové tkáni nejsou dostupné žádné informace. Abychom jej stanovili, provedli jsme HEC u zdravých jedinců,

pacientů s porušenou glukózovou tolerancí (IGT) a DM2 pacientů. Překvapivě jsme nenalezli žádné signifikantní změny v plazmatických hladinách clusterinu během HEC, a to v žádné ze zkoumaných skupin. Plocha pod křivkou plazmatického clusterinu během HEC ani jeho exprese v naší studii nekorelovala s indexem inzulinové senzitivity. mRNA exprese clusterinu byla zvýšena na konci HEC oproti bazální hodnotě pouze u normoglykemické skupiny, ale ne u IGT a DM2 skupiny, tedy u pacientů s inzulinovou rezistencí. Vysvětlení této skutečnosti bohužel zůstává nejasné a vyžaduje další zkoumání na větším množství pacientů. Můžeme pouze spekulovat, že při inzulinové rezistenci dochází k poškození lokálních regulačních drah clusterinu v tukové tkáni.

Kromě clusterinu a s ním souvisejícího leptinu jsme se zabývali mRNA expresí dalších tří relativně nedávno objevených adipokinů, které by se mohly podílet na regulaci zánětu a inzulinové rezistence v tukové tkáni. Konkrétně se jednalo o glypican 4, chemerin a netrin 1. U všech těchto genů jsme stanovili mRNA expresi v podkožní tukové tkáni u zdravých štíhlých probandů a obézních pacientů s a bez DM2, a to před a po VLCD.

U netrinu 1 jsme nezjistili žádné rozdíly v mRNA expresi mezi sledovanými skupinami, a to navzdory jediné dostupné studii, podle níž by měla být mRNA exprese u obézních pacientů zvýšená (Ramkhelawon *et al.* 2014). Tento rozpor si vysvětlujeme tím, že zatímco my jsme zkoumali subkutánní, ve studii Ramkhelawon *et al.* (Ramkhelawon *et al.* 2014) věnovali metabolicky aktivnější viscerální tukové tkáni.

Bazální hodnoty mRNA exprese glypicanu 4 nebyly rozdílné mezi kontrolní skupinou a obézními pacienty s nebo bez DM2 a tyto dvě skupiny se ani nelišily mezi sebou. To je v rozporu s výsledky dřívějších prací, ve kterých exprese glypicanu 4 v podkožní tukové tkáni negativně korelovala s BMI a dalšími ukazateli tělesné konstituce (Gesta *et al.* 2006; Ussar *et al.* 2012). Vlivem VLCD ovšem došlo k významnému nárůstu v DM2, ale ne OB skupině. Vidíme zde tedy opačnou situaci, než jsme zaznamenali u clusterinu.

Obézní pacienti s i bez DM2 měli bazálně sníženou expresi chemerinu oproti kontrolní skupině. To je překvapivé zjištění, protože dle dostupných prací by exprese chemerinu měla být v podkožní tukové tkáni u pacientů s počínajícím metabolickým syndromem nebo s DM2 naopak zvýšena (Chakaroun *et al.* 2012; Jialal *et al.* 2013) VLCD nevedla k normalizaci exprese chemerinu. Můžeme se domnívat, že pokles váhy daný dva týdny trvající VLCD nebyl dostatečný, aby způsobil změny v mRNA expresi chemerinu v podkožní tukové tkáni.

10. Závěr

Léčbě a prevenci obezity je v současné době věnována stále větší pozornost. Přesto její incidence ve světě neustále stoupá a stoupá i výskyt metabolického syndromu, který sdružuje komorbiditu s obezitou často asociované jako jsou diabetes mellitus 2. typu, dyslipidémie a arteriální hypertenze. Jejich kombinace pak vede ke zvýšenému riziku kardiovaskulární morbiditu a mortality. S tím také úměrně roste zátěž a finanční prostředky potřebné pro zdravotní systém.

Inzulínová rezistence je primární odchylkou u metabolického syndromu vedoucí ke vzniku jeho přidružených komplikací. Hlubší pochopení inzulínové rezistence tak představuje cestu k nalezení účinnější léčby těchto civilizačních chorob. S tím souvisí také nutnost dalšího výzkumu patofyziologických mechanismů vzniku inzulínové rezistence ve svalové, jaterní a především tukové tkáni. Za jednu z hlavních příčin vzniku inzulínové rezistence je považován mírný chronický zánět tukové tkáně (Rasouli, Kern 2008). Ten je typicky asociován s obezitou, metabolickým syndromem a dalšími onemocněními. Je charakteristický zvýšenými hladinami některých prozánětlivých markerů a proteinů akutní fáze v cirkulaci i samotné tukové tkáni (Landini *et al.* 2016). Pochopení přesných mechanismů vedoucích k zánětu tukové tkáně je zásadní pro vývoj léčby s ním spojených onemocnění a komplikací. Cílem naší práce, ale i studia tukové tkáně obecně, proto bylo hledat mechanismy, které by mohly pomoci zabránit rozvoji tohoto zánětu, případně by přispěly k jeho léčbě.

Léčebná hluboká hypotermie je metoda chránící rizikové pacienty před vznikem ischemie tkání a v důsledku i s ní souvisejícího zánětu. Její využití u pacientů na jednotkách intenzivní péče předchází poškození mozku (Yenari, Hemmen 2010). U prasat pak byl prokázán její pozitivní vliv na celkovou prognózu při závažných traumatických poraněních (Alam *et al.* 2002; Alam *et al.* 2006). Ovšem o efektu hypotermie na endokrinní funkci tukové tkáně bylo doposud známo jen minimum informací. Kardiologická operace představuje pro organismus zásadní stresový podnět, který může vést až ke vzniku akutní zánětlivé reakce, která ve výsledku vede k výrazně zhoršené prognóze pacienta. Proto jsme si dali za cíl zjistit, jaký vliv má hluboká hypotermie během kardiologické operace na vznik zánětu a další děje v tukové tkáni.

Výsledky naší studie ukazují, že hluboká hypotermie potlačuje vznik systémové zánětlivé reakce organismu. V tukové tkáni ovlivňuje hypotermie mRNA expresi genů souvisejících se zánětem a reakcí na oxidační stres během a po elektivní kardiologické operaci.

Jejím působením dochází k oddálení vzniku lokální zánětlivé reakce v tukové tkáni. Z našich výsledků dále vyplývá, že hluboká hypotermie slouží jako ochrana před vznikem hypoxie v tukové tkáni a tím vede k zlepšení prognózy pacientů podstupujících elektivní kardiochirurgický výkon.

Hledání potenciálních nových možností léčby zánětu v tukové tkáni a z něj plynoucích patologických stavů je jedním z hlavních úkolů současného výzkumu tukové tkáně. Proto je zásadní hledání nových adipokinů a snaha objasňovat jejich funkci v organismu. V této práci jsme se zaměřili primárně na clusterin, protein exprimovaný většinou buněčných typů a vyskytující se ve všech tělních tekutinách (Aronow *et al.* 1993). Jeho role v organismu ovšem zatím není zcela zřejmá. Je mu přisuzována celá řada funkcí od regulace transportu lipidů, přes regulaci buněčné migrace a apoptózy, až po roli chaperonu chránícího buňky před stresem (Humphreys *et al.* 1999; Jenne *et al.* 1991; Trougakos, Gonos 2002). Avšak práce dokazující tyto jeho úlohy si často odporují. V naší studii se podobně jako v jiných pracích nepodařilo prokázat souvislost plazmatických koncentrací clusterinu s BMI nebo inzulinovou rezistencí – ať již definovanou přítomností diabetes mellitus 2. typu nebo na základě indexu inzulinové senzitivity spočítaném při hyperinzulinemickém euglykemickém clampu. Dále jsme zjistili, že systémové hladiny clusterinu nejsou přímo ovlivněny intervencemi vedoucími k redukci hmotnosti. Z těchto výsledků vyvozujeme závěr, že clusterin nemá významnou systémovou úlohu v etiopatogenezi metabolických komplikací obezity a inzulinové rezistence a pravděpodobně nemá významnou roli v modulaci energetické homeostázy organismu.

V naší práci jsme dále zkoumali mRNA expresi clusterinu v podkožní tukové tkáni. Ukázali jsme, že je na rozdíl od plazmatických koncentrací ovlivněna přítomností obezity. Vzhledem k tomu, že exprese clusterinu se nelišila mezi skupinami obézních pacientů s a bez DM2, předpokládáme, že mRNA exprese je ovlivněna primárně přítomností či nepřítomností obezity, ale nikoliv inzulinovou rezistencí. Váhový úbytek způsobený VLCD na rozdíl od bariatrické operace nebyl dostatečný na to, aby vyvolal změny v mRNA expresi clusterinu v tukové tkáni. Změnu mRNA exprese clusterinu vyvolanou akutními změnami glykémie a hladin inzulinu při hyperinzulinemickém euglykemickém clampu jsme zaznamenali pouze u pacientů bez inzulinové rezistence. To ukazuje na určité poškození lokálních regulačních drah clusterinu v tukové tkáni při inzulinové rezistenci.

Z našich výsledků tedy vyplývá, že clusterin má pravděpodobně pouze lokální regulační úlohu v tukové tkáni a nehraje systémovou úlohu v regulaci energetické homeostázy.

Jednou z možných funkcí clusterinu v tukové tkáni by mohl být podíl na regulaci buněčné apoptózy, na potvrzení této teorie je ovšem potřeba dalšího výzkumu.

Inzulínová rezistence a zánět v tukové tkáni jsou velmi komplexní problematiky, jejichž plné pochopení vyžaduje prozkoumání širokého spektra dějů. Neexistuje proto jednoduchá cesta, jak těmto procesům zabránit. Věříme, že výsledky naší práce přidají další střípek do mozaiky, která nakonec povede k nalezení účinné prevence, a především léčby těchto patologických stavů.

11. Literatura

- ABATE N., GARG A., PESHOCK R. M., STRAY-GUNDERSEN J., ADAMS-HUET B., GRUNDY S. M. Relationship of generalized and regional adiposity to insulin sensitivity in men with NIDDM. *Diabetes*, 1996, 45(12), 1684-1693.
- ABEL E. D., PERONI O., KIM J. K., KIM Y. B., BOSS O., HADRO E., MINNEMANN T., SHULMAN G. I., KAHN B. B. Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature*, 2001, 409(6821), 729-733.
- AFZAL S., TYBJAERG-HANSEN A., JENSEN G. B., NORDESTGAARD B. G. Change in Body Mass Index Associated With Lowest Mortality in Denmark, 1976-2013. *JAMA*, 2016, 315(18), 1989-1996.
- AGUIRRE V., UCHIDA T., YENUSH L., DAVIS R., WHITE M. F. The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J Biol Chem*, 2000, 275(12), 9047-9054.
- AGUIRRE V., WERNER E. D., GIRAUD J., LEE Y. H., SHOELSON S. E., WHITE M. F. Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *J Biol Chem*, 2002, 277(2), 1531-1537.
- AHIMA R. S., PRABAKARAN D., MANTZOROS C., QU D., LOWELL B., MARATOS-FLIER E., FLIER J. S. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*, 1996, 382(6588), 250-252.
- ALAM H. B., BOWYER M. W., KOUSTOVA E., GUSHCHIN V., ANDERSON D., STANTON K., KREISHMAN P., CRYER C. M. T., HANCOCK T., RHEE P. Learning and memory is preserved after induced asanguineous hyperkalemic hypothermic arrest in a swine model of traumatic exsanguination. *Surgery*, 2002, 132(2), 278-288.
- ALAM H. B., RHEE P., HONMA K., CHEN H., AYUSTE E. C., LIN T., TORUNO K., MEHRANI T., ENGEL C., CHEN Z. Does the Rate of Rewarming from Profound Hypothermic Arrest Influence the Outcome in a Swine Model of Lethal Hemorrhage? *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 2006, 60(1), 134-146.
- ALFADDA A. A., SALLAM R. M., CHISHTI M. A., MOUSTAFA A. S., FATMA S., ALOMAIM W. S., AL-NAAMI M. Y., BASSAS A. F., CHROUSOS G. P., JO H. Differential patterns of serum concentration and adipose tissue expression of chemerin in obesity: adipose depot specificity and gender dimorphism. *Mol Cells*, 2012, 33(6), 591-596.
- ALVEHUS M., BUREN J., SJOSTROM M., GOEDECKE J., OLSSON T. The human visceral fat depot has a unique inflammatory profile. *Obesity (Silver Spring)*, 2010, 18(5), 879-883.
- ARAKI E., LIPES M. A., PATTI M. E., BRUNING J. C., HAAG B., 3RD, JOHNSON R. S., KAHN C. R. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature*, 1994, 372(6502), 186-190.
- ARNOLD T., BRANDLHOFFER S., VRTIKAPA K., STANGL H., HERMANN M., ZWIAUER K., MANGGE H., KARWAUTZ A., HUEMER J., KOLLER D., SCHNEIDER W. J., STROBL W. Effect of obesity on plasma clusterin, [corrected] a proposed modulator of leptin action. *Pediatric research*, 2011, 69(3), 237-242.

ARONOW B. J., LUND S. D., BROWN T. L., HARMONY J. A., WITTE D. P. Apolipoprotein J expression at fluid-tissue interfaces: potential role in barrier cytoprotection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90(2), 725-729.

ARTHUR J. R. The glutathione peroxidases. *Cell Mol Life Sci*, 2000, 57(13-14), 1825-1835.

ASTERHOLM I. W., TAO C., MORLEY T. S., WANG Q. A., DELGADO-LOPEZ F., WANG Z. V., SCHERER P. E. Adipocyte Inflammation Is Essential for Healthy Adipose Tissue Expansion and Remodeling. *Cell Metabolism*, 2014, 20(1), 103-118.

AY E., MARAKOGLU K., KIZMAZ M., UNLU A. Evaluation of Netrin-1 Levels and Albuminuria in Patients With Diabetes. *J Clin Lab Anal*, 2016, 30(6), 972-977.

BADO A., LEVASSEUR S., ATTOUB S., KERMORGANT S., LAIGNEAU J. P., BORTOLUZZI M. N., MOIZO L., LEHY T., GUERRE-MILLO M., LE MARCHAND-BRUSTEL Y., LEWIN M. J. M. The stomach is a source of leptin. *Nature*, 1998, 394(6695), 790-793.

BAGGIOLINI M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*, 1998, 392(6676), 565-568.

BAJARI T. M., STRASSER V., NIMPF J., SCHNEIDER W. J. A model for modulation of leptin activity by association with clusterin. *FASEB J*, 2003, 17(11), 1505-1507.

BAKER A. R., SILVA N. F., QUINN D. W., HARTE A. L., PAGANO D., BONSER R. S., KUMAR S., MCTERNAN P. G. Human epicardial adipose tissue expresses a pathogenic profile of adipocytokines in patients with cardiovascular disease. *Cardiovasc Diabetol*, 2006, 5, 1.

BANERJI M. A., BUCKLEY M. C., CHAIKEN R. L., GORDON D., LEOVITZ H. E., KRAL J. G. Liver fat, serum triglycerides and visceral adipose tissue in insulin-sensitive and insulin-resistant black men with NIDDM. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 1995, 19(12), 846-850.

BARALLA A., SOTGIU E., DEIANA M., PASELLA S., PINNA S., MANNU A., CANU E., SOTGIU G., GANAU A., ZINELLU A., SOTGIA S., CARRU C., DEIANA L. Plasma Clusterin and Lipid Profile: A Link with Aging and Cardiovascular Diseases in a Population with a Consistent Number of Centenarians. *PLoS One*, 2015, 10(6), e0128029.

BEILIN B., SHAVIT Y., RAZUMOVSKY J., WOLLOCH Y., ZEIDEL A., BESSLER H. Effects of mild perioperative hypothermia on cellular immune responses. *Anesthesiology*, 1998, 89(5), 1133-1140.

BERNARD S. A., GRAY T. W., BUIST M. D., JONES B. M., SILVESTER W., GUTTERIDGE G., SMITH K. Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia. *N Engl J Med*, 2002, 346(8), 557-563.

BERNHAGEN J., KROHN R., LUE H., GREGORY J. L., ZERNECKE A., KOENEN R. R., DEWOR M., GEORGIEV I., SCHOBER A., LENG L., KOOISTRA T., FINGERLE-ROWSON G., GHEZZI P., KLEEMANN R., MCCOLL S. R., BUCALA R., HICKEY M. J., WEBER C. MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat Med*, 2007, 13(5), 587-596.

BHOWMIK B., AFSANA F., SIDDIQUEE T., MUNIR S. B., SHEIKH F., WRIGHT E., BHUIYAN F. R., ASHRAFUZZAMAN S. M., MAHTAB H., AZAD KHAN A. K., HUSSAIN A. Comparison of the prevalence of metabolic syndrome and its association with diabetes and cardiovascular disease in the rural population of Bangladesh using the modified

National Cholesterol Education Program Expert Panel Adult Treatment Panel III and International Diabetes Federation definitions. *J Diabetes Investig*, 2015, 6(3), 280-288.

BISCHOFF S. C., KRIEGER M., BRUNNER T., DAHINDEN C. A. Monocyte chemotactic protein 1 is a potent activator of human basophils. *J Exp Med*, 1992, 175(5), 1271-1275.

BJORBAEK C., KAHN B. B. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog Horm Res*, 2004, 59, 305-331.

BLANKENBERG S., RUPPRECHT H. J., BICKEL C., TORZEWSKI M., HAFNER G., TIRET L., SMIEJA M., CAMBIEN F., MEYER J., LACKNER K. J., ATHEROGENE I. Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med*, 2003, 349(17), 1605-1613.

BLASCHUK O., BURDZY K., FRITZ I. B. Purification and characterization of a cell-aggregating factor (clusterin), the major glycoprotein in ram rete testis fluid. *J Biol Chem*, 1983, 258(12), 7714-7720.

BLASZAK J., SZOLKIEWICZ M., SUCAJTYS-SZULC E., KONARZEWSKI M., LIZAKOWSKI S., SWIERCZYNSKI J., RUTKOWSKI B. High serum chemerin level in CKD patients is related to kidney function, but not to its adipose tissue overproduction. *Ren Fail*, 2015, 1-6.

BOBBERT T., SCHWARZ F., FISCHER-ROSINSKY A., MAURER L., MOHLIG M., PFEIFFER A. F., MAI K., SPRANGER J. Chemerin and prediction of Diabetes mellitus type 2. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2015, 82(6), 838-843.

BODEN G., JADALI F., WHITE J., LIANG Y., MOZZOLI M., CHEN X., COLEMAN E., SMITH C. Effects of fat on insulin-stimulated carbohydrate metabolism in normal men. *J Clin Invest*, 1991, 88(3), 960-966.

BOZAOGLU K., CURRAN J. E., STOCKER C. J., ZAIBI M. S., SEGAL D., KONSTANTOPOULOS N., MORRISON S., CARLESS M., DYER T. D., COLE S. A., GORING H. H., MOSES E. K., WALDER K., CAWTHORNE M. A., BLANGERO J., JOWETT J. B. Chemerin, a novel adipokine in the regulation of angiogenesis. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95(5), 2476-2485.

BOZAOGLU K., SEGAL D., SHIELDS K. A., CUMMINGS N., CURRAN J. E., COMUZZIE A. G., MAHANEY M. C., RAINWATER D. L., VANDEBERG J. L., MACCLUER J. W., COLLIER G., BLANGERO J., WALDER K., JOWETT J. B. Chemerin is associated with metabolic syndrome phenotypes in a Mexican-American population. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009, 94(8), 3085-3088.

BREMER A. A., JIALAL I. Adipose tissue dysfunction in nascent metabolic syndrome. *J Obes*, 2013, 2013, 393192.

BRITTON K. A., MASSARO J. M., MURABITO J. M., KREGER B. E., HOFFMANN U., FOX C. S. Body fat distribution, incident cardiovascular disease, cancer, and all-cause mortality. *Journal of the American College of Cardiology*, 2013, 62(10), 921-925.

BROWN D. J., BRUGGER H., BOYD J., PAAL P. Accidental hypothermia. *N Engl J Med*, 2012, 367(20), 1930-1938.

BRUUN J. M., LIHN A. S., PEDERSEN S. B., RICHELSEN B. Monocyte chemoattractant protein-1 release is higher in visceral than subcutaneous human adipose tissue (AT):

implication of macrophages resident in the AT. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90(4), 2282-2289.

BUCALA R. MIF rediscovered: cytokine, pituitary hormone, and glucocorticoid-induced regulator of the immune response. *FASEB J*, 1996, 10(14), 1607-1613.

BUCHOLZ E. M., RATHORE S. S., REID K. J., JONES P. G., CHAN P. S., RICH M. W., SPERTUS J. A., KRUMHOLZ H. M. Body mass index and mortality in acute myocardial infarction patients. *Am J Med*, 2012, 125(8), 796-803.

BULLO M., GARCIA-LORDA P., MEGIAS I., SALAS-SALVADO J. Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression. *Obesity Research*, 2003, 11(4), 525-531.

BYUN H. R., KIM D. K., KOH J. Y. Obesity and downregulated hypothalamic leptin receptors in male metallothionein-3-null mice. *Neurobiol Dis*, 2011, 44(1), 125-132.

CACCAMO A. E., SCALTRITI M., CAPORALI A., D'ARCA D., CORTI A., CORVETTA D., SALA A., BETTUZZI S. Ca²⁺ depletion induces nuclear clusterin, a novel effector of apoptosis in immortalized human prostate cells. *Cell Death Differ*, 2005, 12(1), 101-104.

CAI R., HAN J., SUN J., HUANG R., TIAN S., SHEN Y., DONG X., XIA W., WANG S. Plasma Clusterin and the CLU Gene rs11136000 Variant Are Associated with Mild Cognitive Impairment in Type 2 Diabetic Patients. *Front Aging Neurosci*, 2016, 8, 179.

CALANDRA T., BERNHAGEN J., METZ C. N., SPIEGEL L. A., BACHER M., DONNELLY T., CERAMI A., BUCALA R. MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature*, 1995, 377(6544), 68-71.

CALANDRA T., BERNHAGEN J., MITCHELL R. A., BUCALA R. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J Exp Med*, 1994, 179(6), 1895-1902.

CALANDRA T., ECHTENACHER B., ROY D. L., PUGIN J., METZ C. N., HULTNER L., HEUMANN D., MANNEL D., BUCALA R., GLAUSER M. P. Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nat Med*, 2000, 6(2), 164-170.

CAMARGO A., PENA-ORIHUELA P., RANGEL-ZUNIGA O. A., PEREZ-MARTINEZ P., DELGADO-LISTA J., CRUZ-TENO C., MARIN C., TINAHONES F., MALAGON M. M., ROCHE H. M., PEREZ-JIMENEZ F., LOPEZ-MIRANDA J. Peripheral blood mononuclear cells as in vivo model for dietary intervention induced systemic oxidative stress. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 2014, 72, 178-186.

CANCELLO R., HENEGAR C., VIGUERIE N., TALEB S., POITOU C., ROUAULT C., COUPAYE M., PELLOUX V., HUGOL D., BOUILLOT J. L., BOULOUMIE A., BARBATELLI G., CINTI S., SVENSSON P. A., BARSH G. S., ZUCKER J. D., BASDEVANT A., LANGIN D., CLEMENT K. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes*, 2005, 54(8), 2277-2286.

CANI P. D., AMAR J., IGLESIAS M. A., POGGI M., KNAUF C., BASTELICA D., NEYRINCK A. M., FAVA F., TUOHY K. M., CHABO C., WAGET A., DELMEE E., COUSIN B., SULPICE T., CHAMONTIN B., FERRIERES J., TANTI J. F., GIBSON G. R.,

- CASTEILLA L., DELZENNE N. M., ALESSI M. C., BURCELIN R. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*, 2007, 56(7), 1761-1772.
- CARR M. W., ROTH S. J., LUTHER E., ROSE S. S., SPRINGER T. A. Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91(9), 3652-3656.
- CATALAN V., GOMEZ-AMBROSI J., RODRIGUEZ A., RAMIREZ B., VALENTI V., MONCADA R., SILVA C., SALVADOR J., FRUHBECK G. Peripheral mononuclear blood cells contribute to the obesity-associated inflammatory state independently of glycemic status: involvement of the novel proinflammatory adipokines chemerin, chitinase-3-like protein 1, lipocalin-2 and osteopontin. *Genes Nutr*, 2015, 10(3), 460.
- CINTI S., MITCHELL G., BARBATELLI G., MURANO I., CERESI E., FALOIA E., WANG S., FORTIER M., GREENBERG A. S., OBIN M. S. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res*, 2005, 46(11), 2347-2355.
- CLARIA J., GONZALEZ-PERIZ A., LOPEZ-VICARIO C., RIUS B., TITOS E. New insights into the role of macrophages in adipose tissue inflammation and Fatty liver disease: modulation by endogenous omega-3 Fatty Acid-derived lipid mediators. *Front Immunol*, 2011, 2, 49.
- COCK T. A., AUWERX J. Leptin: cutting the fat off the bone. *Lancet*, 2003, 362(9395), 1572-1574.
- COETZEE D., HILDEBRAND K., BOULLE A., MAARTENS G., LOUIS F., LABATALA V., REUTER H., NTWANA N., GOEMAERE E. Outcomes after two years of providing antiretroviral treatment in Khayelitsha, South Africa. *AIDS*, 2004, 18(6), 887-895.
- COIMBRA S., BRANDAO PROENCA J., SANTOS-SILVA A., NEUPARTH M. J. Adiponectin, leptin, and chemerin in elderly patients with type 2 diabetes mellitus: a close linkage with obesity and length of the disease. *Biomed Res Int*, 2014, 2014, 701915.
- COPPACK S. W. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *Proc Nutr Soc*, 2001, 60(3), 349-356.
- CORALLO C., PAULESU L., CUTOLO M., IETTA F., CAROTENUTO C., MANNELLI C., ROMAGNOLI R., NUTI R., GIORDANO N. Serum levels, tissue expression and cellular secretion of macrophage migration inhibitory factor in limited and diffuse systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol*, 2015, 33(4 Suppl 91), S98-105.
- COYLE P., PHILCOX J. C., CAREY L. C., ROFE A. M. Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci*, 2002, 59(4), 627-647.
- CROSBY A. J., WAHLE K. W., DUTHIE G. G. Modulation of glutathione peroxidase activity in human vascular endothelial cells by fatty acids and the cytokine interleukin-1 beta. *Biochim Biophys Acta*, 1996, 1303(3), 187-192.
- CUSI K., MAEZONO K., OSMAN A., PENDERGRASS M., PATTI M. E., PRATIPANAWATR T., DEFRONZO R. A., KAHN C. R., MANDARINO L. J. Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *J Clin Invest*, 2000, 105(3), 311-320.
- DAHLMAN I., KAAMAN M., OLSSON T., TAN G. D., BICKERTON A. S., WAHLEN K., ANDERSSON J., NORDSTROM E. A., BLOMQVIST L., SJOGREN A., FORSGREN M.,

ATTERSAND A., ARNER P. A unique role of monocyte chemoattractant protein 1 among chemokines in adipose tissue of obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90(10), 5834-5840.

DAIMON M., OIZUMI T., KARASAWA S., KAINO W., TAKASE K., TADA K., JIMBU Y., WADA K., KAMEDA W., SUSAKI S., MURAMATSU M., KUBOTA I., KAWATA S., KATO T. Association of the clusterin gene polymorphisms with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*, 2011, 60(6), 815-822.

DANDONA P., ALJADA A., GHANIM H., MOHANTY P., TRIPATHY C., HOFMEYER D., CHAUDHURI A. Increased plasma concentration of macrophage migration inhibitory factor (MIF) and MIF mRNA in mononuclear cells in the obese and the suppressive action of metformin. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89(10), 5043-5047.

DEFRONZO R. A. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med Clin North Am*, 2004, 88(4), 787-835, ix.

DESPRES J. P. Abdominal obesity as important component of insulin-resistance syndrome. *Nutrition*, 1993, 9(5), 452-459.

DEY D., NAKAZATO R., LI D., BERMAN D. S. Epicardial and thoracic fat - Noninvasive measurement and clinical implications. *Cardiovasc Diagn Ther*, 2012, 2(2), 85-93.

DISPIRITO J. R., MATHIS D. Immunological contributions to adipose tissue homeostasis. *Semin Immunol*, 2015, 27(5), 315-321.

DJEU J. Y., WEI S. Clusterin and chemoresistance. *Adv Cancer Res*, 2009, 105, 77-92.

DOEHNER W., ERDMANN E., CAIRNS R., CLARK A. L., DORMANDY J. A., FERRANNINI E., ANKER S. D. Inverse relation of body weight and weight change with mortality and morbidity in patients with type 2 diabetes and cardiovascular co-morbidity: an analysis of the PROactive study population. *Int J Cardiol*, 2012, 162(1), 20-26.

DUSSERRE E., MOULIN P., VIDAL H. Differences in mRNA expression of the proteins secreted by the adipocytes in human subcutaneous and visceral adipose tissues. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1500(1), 88-96.

FAIN J. N. Release of interleukins and other inflammatory cytokines by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily due to the nonfat cells. *Vitam Horm*, 2006, 74, 443-477.

FAIN J. N., MADAN A. K., HILER M. L., CHEEMA P., BAHOUTH S. W. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology*, 2004, 145(5), 2273-2282.

FAN C., LI Q., ROSS D., ENGELHARDT J. F. Tyrosine phosphorylation of I kappa B alpha activates NF kappa B through a redox-regulated and c-Src-dependent mechanism following hypoxia/reoxygenation. *J Biol Chem*, 2003, 278(3), 2072-2080.

FANELLI C., CALDERONE S., EPIFANO L., DE VINCENZO A., MODARELLI F., PAMPANELLI S., PERRIELLO G., DE FEO P., BRUNETTI P., GERICH J. E., ET AL. Demonstration of a critical role for free fatty acids in mediating counterregulatory stimulation of gluconeogenesis and suppression of glucose utilization in humans. *J Clin Invest*, 1993, 92(4), 1617-1622.

FANTUZZI G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, 2005, 115(5), 911-919; quiz 920.

FATIMA S. S., BUTT Z., BADER N., PATHAN A. Z., HUSSAIN S., IQBAL N. T. Role of multifunctional Chemerin in obesity and preclinical diabetes. *Obes Res Clin Pract*, 2015, 9(5), 507-512.

FEDERATION I. D. New IDF worldwide definition of the metabolic syndrome. Press Conference, 1st International Congress on 'Prediabetes' and the Metabolic Syndrome, Berlin, Germany, April 14, 2005.2005.

FEINSTEIN R., KANETY H., PAPA M. Z., LUNENFELD B., KARASIK A. Tumor necrosis factor- α suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates. *J Biol Chem*, 1993, 268(35), 26055-26058.

FINOCCHIETTO P. V., HOLOD S., BARREYRO F., PERALTA J. G., ALIPPE Y., GIOVAMBATTISTA A., CARRERAS M. C., PODEROSO J. J. Defective leptin-AMP-dependent kinase pathway induces nitric oxide release and contributes to mitochondrial dysfunction and obesity in ob/ob mice. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 15(9), 2395-2406.

FISCHER A. W., HOEFIG C. S., ABREU-VIEIRA G., DE JONG J. M., PETROVIC N., MITTAG J., CANNON B., NEDERGAARD J. Leptin Raises Defended Body Temperature without Activating Thermogenesis. *Cell Rep*, 2016, 14(7), 1621-1631.

FLIER J. S. Clinical review 94: What's in a name? In search of leptin's physiologic role. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998, 83(5), 1407-1413.

FLIER J. S. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell*, 2004, 116(2), 337-350.

FLIER J. S., HARRIS M., HOLLENBERG A. N. Leptin, nutrition, and the thyroid: the why, the wherefore, and the wiring. *J Clin Invest*, 2000, 105(7), 859-861.

FOROUHI N. G., JENKINSON G., THOMAS E. L., MULLICK S., MIERISOVA S., BHONSLE U., MCKEIGUE P. M., BELL J. D. Relation of triglyceride stores in skeletal muscle cells to central obesity and insulin sensitivity in European and South Asian men. *Diabetologia*, 1999, 42(8), 932-935.

FRAYN K. N., KARPE F., FIELDING B. A., MACDONALD I. A., COPPACK S. W. Integrative physiology of human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2003, 27(8), 875-888.

FRIED M., YUMUK V., OPPERT J. M., SCOPINARO N., TORRES A. J., WEINER R., YASHKOV Y., FRUHBECK G., EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF O., INTERNATIONAL FEDERATION FOR THE SURGERY OF OBESITY - EUROPEAN C. Interdisciplinary European Guidelines on metabolic and bariatric surgery. *Obes Facts*, 2013, 6(5), 449-468.

FRIED S. K., BUNKIN D. A., GREENBERG A. S. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998, 83(3), 847-850.

FRIEDMAN J. M., HALAAS J. L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, 1998, 395(6704), 763-770.

- FRITZ I. B., BURDZY K., SETCHELL B., BLASCHUK O. Ram rete testis fluid contains a protein (clusterin) which influences cell-cell interactions in vitro. *Biol Reprod*, 1983, 28(5), 1173-1188.
- GALGANI J. E., HEILBRONN L. K., AZUMA K., KELLEY D. E., ALBU J. B., PISUNYER X., SMITH S. R., RAVUSSIN E., LOOK A. A. R. G. Metabolic flexibility in response to glucose is not impaired in people with type 2 diabetes after controlling for glucose disposal rate. *Diabetes*, 2008, 57(4), 841-845.
- GALLI A., ROURE A., ZELLER R., DONO R. Glypican 4 modulates FGF signalling and regulates dorsoventral forebrain patterning in *Xenopus* embryos. *Development*, 2003, 130(20), 4919-4929.
- GAO S., ZHANG X., QIN Y., XU S., ZHANG J., WANG Z., WANG W., KONG D., LI C. Dual actions of Netrin-1 on islet insulin secretion and immune modulation. *Clin Sci (Lond)*, 2016, 130(21), 1901-1911.
- GAO X., MI S., ZHANG F., GONG F., LAI Y., GAO F., ZHANG X., WANG L., TAO H. Association of chemerin mRNA expression in human epicardial adipose tissue with coronary atherosclerosis. *Cardiovasc Diabetol*, 2011, 10, 87.
- GAO Z., ZHANG X., ZUBERI A., HWANG D., QUON M. J., LEFEVRE M., YE J. Inhibition of insulin sensitivity by free fatty acids requires activation of multiple serine kinases in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol*, 2004, 18(8), 2024-2034.
- GARCIA M. A., GANTT R. M. Intraoperative Hypothermia - Physiologic Implications and Prevention. *Problems in Anesthesia*, 1994a.
- GARCIA M. A., GANTT R. M. Intraoperative Hypothermia: Physiologic implication and prevention. *Problems in Anesthesia*, 1994b, 8(1), 44-53.
- GERMAN C. L., SAUER B. M., HOWE C. L. The STAT3 beacon: IL-6 recurrently activates STAT 3 from endosomal structures. *Exp Cell Res*, 2011, 317(14), 1955-1969.
- GESTA S., BLUHER M., YAMAMOTO Y., NORRIS A. W., BERNDT J., KRALISCH S., BOUCHER J., LEWIS C., KAHN C. R. Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(17), 6676-6681.
- GHANIM H., ALJADA A., HOFMEYER D., SYED T., MOHANTY P., DANDONA P. Circulating mononuclear cells in the obese are in a proinflammatory state. *Circulation*, 2004, 110(12), 1564-1571.
- GIL S. Y., YOUN B. S., BYUN K., HUANG H., NAMKOONG C., JANG P. G., LEE J. Y., JO Y. H., KANG G. M., KIM H. K., SHIN M. S., PIETRZIK C. U., LEE B., KIM Y. B., KIM M. S. Clusterin and LRP2 are critical components of the hypothalamic feeding regulatory pathway. *Nat Commun*, 2013, 4, 1862.
- GLOBUS M. Y., ALONSO O., DIETRICH W. D., BUSTO R., GINSBERG M. D. Glutamate release and free radical production following brain injury: effects of posttraumatic hypothermia. *J Neurochem*, 1995, 65(4), 1704-1711.
- GONZALEZ-MUNIESA P., MARRADES M. P., MARTINEZ J. A., MORENO-ALIAGA M. J. Differential proinflammatory and oxidative stress response and vulnerability to metabolic syndrome in habitual high-fat young male consumers putatively predisposed by their genetic background. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(9), 17238-17255.

- GONZALEZ F., ROTE N. S., MINIUM J., WEAVER A. L., KIRWAN J. P. Elevated circulating levels of macrophage migration inhibitory factor in polycystic ovary syndrome. *Cytokine*, 2010, 51(3), 240-244.
- GOODYEAR L. J., GIORGINO F., SHERMAN L. A., CAREY J., SMITH R. J., DOHM G. L. Insulin receptor phosphorylation, insulin receptor substrate-1 phosphorylation, and phosphatidylinositol 3-kinase activity are decreased in intact skeletal muscle strips from obese subjects. *J Clin Invest*, 1995, 95(5), 2195-2204.
- GOOSSENS G. H., BIZZARRI A., VENTECLEF N., ESSERS Y., CLEUTJENS J. P., KONINGS E., JOCKEN J. W., CAJLAKOVIC M., RIBITSCH V., CLEMENT K., BLAAK E. E. Increased adipose tissue oxygen tension in obese compared with lean men is accompanied by insulin resistance, impaired adipose tissue capillarization, and inflammation. *Circulation*, 2011, 124(1), 67-76.
- GOOSSENS G. H., BLAAK E. E. Adipose tissue oxygen tension: implications for chronic metabolic and inflammatory diseases. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2012, 15(6), 539-546.
- GORDON S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3(1), 23-35.
- GRIMSRUD P. A., PICKLO M. J., SR., GRIFFIN T. J., BERNLOHR D. A. Carbonylation of adipose proteins in obesity and insulin resistance: identification of adipocyte fatty acid-binding protein as a cellular target of 4-hydroxynonenal. *Mol Cell Proteomics*, 2007, 6(4), 624-637.
- GRUBERG L., WEISSMAN N. J., WAKSMAN R., FUCHS S., DEIBLE R., PINNOW E. E., AHMED L. M., KENT K. M., PICHARD A. D., SUDDATH W. O., SATLER L. F., LINDSAY J., JR. The impact of obesity on the short-term and long-term outcomes after percutaneous coronary intervention: the obesity paradox? *Journal of the American College of Cardiology*, 2002, 39(4), 578-584.
- GRUNDY S. M. Metabolic syndrome pandemic. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(4), 629-636.
- GULLICKSEN P. S., HAUSMAN D. B., DEAN R. G., HARTZELL D. L., BAILE C. A. Adipose tissue cellularity and apoptosis after intracerebroventricular injections of leptin and 21 days of recovery in rats. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2003, 27(3), 302-312.
- HAGERDAL M., HARP J., NILSSON L., SIESJO B. K. The effect of induced hypothermia upon oxygen consumption in the rat brain. *J Neurochem*, 1975, 24(2), 311-316.
- HAGIHARA K., WATANABE K., CHUN J., YAMAGUCHI Y. Glypican-4 is an FGF2-binding heparan sulfate proteoglycan expressed in neural precursor cells. *Dev Dyn*, 2000, 219(3), 353-367.
- HAINER V., KUNEŠOVÁ M. *Obezita*. Edition ed.: Galén, 1997.
- HALPERIN F., LOPEZ X., MANNING R., KAHN C. R., KULKARNI R. N., GOLDFINE A. B. Insulin augmentation of glucose-stimulated insulin secretion is impaired in insulin-resistant humans. *Diabetes*, 2012, 61(2), 301-309.
- HAMADA N., MIYATA M., ETO H., IKEDA Y., SHIRASAWA T., AKASAKI Y., MIYAUCHI T., FURUSHO Y., NAGAKI A., ARONOW B. J., TEI C. Loss of clusterin limits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice via reduced expression of Egr-1 and TNF-alpha. *J Atheroscler Thromb*, 2011, 18(3), 209-216.

- HAN C. Y., SUBRAMANIAN S., CHAN C. K., OMER M., CHIBA T., WIGHT T. N., CHAIT A. Adipocyte-derived serum amyloid A3 and hyaluronan play a role in monocyte recruitment and adhesion. *Diabetes*, 2007, 56(9), 2260-2273.
- HEBROK M., REICHARDT L. F. Brain meets pancreas: netrin, an axon guidance molecule, controls epithelial cell migration. *Trends Cell Biol*, 2004, 14(4), 153-155.
- HEINRICH P. C., BEHRMANN I., HAAN S., HERMANN S. H. M., MULLER-NEWEN G., SCHAPER F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J*, 2003, 374(Pt 1), 1-20.
- HEINRICH P. C., BEHRMANN I., MULLER-NEWEN G., SCHAPER F., GRAEVE L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J*, 1998, 334 (Pt 2), 297-314.
- HERDER C., KOLB H., KOENIG W., HAASTERT B., MULLER-SCHOLZE S., RATHMANN W., HOLLE R., THORAND B., WICHMANN H. E. Association of systemic concentrations of macrophage migration inhibitory factor with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes: results from the Cooperative Health Research in the Region of Augsburg, Survey 4 (KORA S4). *Diabetes Care*, 2006, 29(2), 368-371.
- HEROVA M., SCHMID M., GEMPERLE C., LORETZ C., HERSBERGER M. Low dose aspirin is associated with plasma chemerin levels and may reduce adipose tissue inflammation. *Atherosclerosis*, 2014, 235(2), 256-262.
- HEYMSFIELD S. B., GREENBERG A. S., FUJIOKA K., DIXON R. M., KUSHNER R., HUNT T., LUBINA J. A., PATANE J., SELF B., HUNT P., MCCAMISH M. Recombinant leptin for weight loss in obese and lean adults: a randomized, controlled, dose-escalation trial. *JAMA*, 1999, 282(16), 1568-1575.
- HILDEBRAND F., GIANNOUDIS P. V., VAN GRIENSVEN M., CHAWDA M., PAPE H. C. Pathophysiologic changes and effects of hypothermia on outcome in elective surgery and trauma patients. *American journal of surgery*, 2004, 187(3), 363-371.
- HILEMAN S. M., PIERROZ D. D., FLIER J. S. Leptin, nutrition, and reproduction: timing is everything. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000, 85(2), 804-807.
- HINDS M. G., LACKMANN M., SKEA G. L., HARRISON P. J., HUANG D. C., DAY C. L. The structure of Bcl-w reveals a role for the C-terminal residues in modulating biological activity. *EMBO J*, 2003, 22(7), 1497-1507.
- HOCKENBERRY D. M., ZUTTER M., HICKEY W., NAHM M., KORSMEYER S. J. BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991, 88(16), 6961-6965.
- HOLMSTROM M. H., TOM R. Z., BJORNHOLM M., GARCIA-ROVES P. M., ZIERATH J. R. Effect of leptin treatment on mitochondrial function in obese leptin-deficient ob/ob mice. *Metabolism*, 2013, 62(9), 1258-1267.
- HOO-PARIS R., JOURDAN M. L., WANG L. C., RAJOTTE R. Insulin secretion and substrate homeostasis in prolonged hypothermia in rats. *Am J Physiol*, 1988, 255(6 Pt 2), R1035-1040.
- HOOFNAGLE A. N., WU M., GOSMANOVA A. K., BECKER J. O., WIJSMAN E. M., BRUNZELL J. D., KAHN S. E., KNOPP R. H., LYONS T. J., HEINECKE J. W. Low

clusterin levels in high-density lipoprotein associate with insulin resistance, obesity, and dyslipoproteinemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(12), 2528-2534.

HOSOGAI N., FUKUHARA A., OSHIMA K., MIYATA Y., TANAKA S., SEGAWA K., FURUKAWA S., TOCHINO Y., KOMURO R., MATSUDA M., SHIMOMURA I. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes*, 2007, 56(4), 901-911.

HOTAMISLIGIL G. S., SHARGILL N. S., SPIEGELMAN B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, 1993, 259(5091), 87-91.

HOUSEKNECHT K. L., MANTZOROS C. S., KULIAWAT R., HADRO E., FLIER J. S., KAHN B. B. Evidence for leptin binding to proteins in serum of rodents and humans: Modulation with obesity. *Diabetes*, 1996, 45(11), 1638-1643.

HOUSTIS N., ROSEN E. D., LANDER E. S. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature*, 2006, 440(7086), 944-948.

HUBE F., BIRGEL M., LEE Y. M., HAUNER H. Expression pattern of tumour necrosis factor receptors in subcutaneous and omental human adipose tissue: role of obesity and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest*, 1999, 29(8), 672-678.

HUMPHREYS D. T., CARVER J. A., EASTERBROOK-SMITH S. B., WILSON M. R. Clusterin has chaperone-like activity similar to that of small heat shock proteins. *J Biol Chem*, 1999, 274(11), 6875-6881.

CHA J. J., MIN H. S., KIM K., LEE M. J., LEE M. H., KIM J. E., SONG H. K., CHA D. R., KANG Y. S. Long-term study of the association of adipokines and glucose variability with diabetic complications. *Korean J Intern Med*, 2016.

CHAKAROUN R., RASCHPICHLER M., KLOTING N., OBERBACH A., FLEHMIG G., KERN M., SCHON M. R., SHANG E., LOHMANN T., DRESSLER M., FASSHAUER M., STUMVOLL M., BLUHER M. Effects of weight loss and exercise on chemerin serum concentrations and adipose tissue expression in human obesity. *Metabolism*, 2012, 61(5), 706-714.

CHALDAKOV G. N., STANKULOV I. S., HRISTOVA M., GHENEV P. I. Adipobiology of disease: adipokines and adipokine-targeted pharmacology. *Curr Pharm Des*, 2003, 9(12), 1023-1031.

CHAN J. L., BLUHER S., YIANNAKOURIS N., SUCHARD M. A., KRATZSCH J., MANTZOROS C. S. Regulation of circulating soluble leptin receptor levels by gender, adiposity, sex steroids, and leptin - Observational and interventional studies in humans. *Diabetes*, 2002, 51(7), 2105-2112.

CHANDEL N. S., MCCLINTOCK D. S., FELICIANO C. E., WOOD T. M., MELENDEZ J. A., RODRIGUEZ A. M., SCHUMACKER P. T. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing. *J Biol Chem*, 2000, 275(33), 25130-25138.

CHEN R. Y., CHIEN S. Hemodynamic functions and blood viscosity in surface hypothermia. *Am J Physiol*, 1978, 235(2), H136-143.

- CHEN Z., CHEN H., RHEE P., KOUSTOVA E., AYUSTE E. C., HONMA K., NADEL A., ALAM H. B. Induction of profound hypothermia modulates the immune/inflammatory response in a swine model of lethal hemorrhage. *Resuscitation*, 2005, 66(2), 209-216.
- CHI K. N., SIU L. L., HIRTE H., HOTTE S. J., KNOX J., KOLLMANSBERGER C., GLEAVE M., GUNS E., POWERS J., WALSH W., TU D., EISENHAUER E. A phase I study of OGX-011, a 2'-methoxyethyl phosphorothioate antisense to clusterin, in combination with docetaxel in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(3), 833-839.
- CHOE S. S., HUH J. Y., HWANG I. J., KIM J. I., KIM J. B. Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2016, 7, 30.
- CHOI-MIURA N. H., IHARA Y., FUKUCHI K., TAKEDA M., NAKANO Y., TOBE T., TOMITA M. SP-40,40 is a constituent of Alzheimer's amyloid. *Acta neuropathologica*, 1992, 83(3), 260-264.
- CHU S. H., LEE M. K., AHN K. Y., IM J. A., PARK M. S., LEE D. C., JEON J. Y., LEE J. W. Chemerin and adiponectin contribute reciprocally to metabolic syndrome. *PLoS One*, 2012, 7(4), e34710.
- IWASAKI Y., NISHIYAMA M., TAGUCHI T., ASAI M., YOSHIDA M., KAMBAYASHI M., TERADA Y., HASHIMOTO K. Insulin exhibits short-term anti-inflammatory but long-term proinflammatory effects in vitro. *Mol Cell Endocrinol*, 2009, 298(1-2), 25-32.
- JAMES R. W., HOCHSTRASSER A. C., BORGHINI I., MARTIN B., POMETTA D., HOCHSTRASSER D. Characterization of a human high density lipoprotein-associated protein, NA1/NA2. Identity with SP-40,40, an inhibitor of complement-mediated cytolysis. *Arterioscler Thromb*, 1991, 11(3), 645-652.
- JAYAKUMAR C., NAUTA F. L., BAKKER S. J., BILO H., GANSEVOORT R. T., JOHNSON M. H., RAMESH G. Netrin-1, a urinary proximal tubular injury marker, is elevated early in the time course of human diabetes. *J Nephrol*, 2014, 27(2), 151-157.
- JEDRZEJUK D., LWOW F., KULICZKOWSKA-PLAKSEJ J., HIRNLE L., TRZMIEL-BIRA A., LENARCIK-KABZA A., KOLACKOV K., LACZMANSKI L., MILEWICZ A. Association of serum glypican-4 levels with cardiovascular risk predictors in women with polycystic ovary syndrome - a pilot study. *Gynecol Endocrinol*, 2016, 32(3), 223-226.
- JENKINS D. D., ROLLINS L. G., PERKEL J. K., WAGNER C. L., KATIKANENI L. P., BASS W. T., KAUFMAN D. A., HORGAN M. J., LANGUANI S., GIVELICHIAN L., SANKARAN K., YAGER J. Y., MARTIN R. H. Serum cytokines in a clinical trial of hypothermia for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2012, 32(10), 1888-1896.
- JENNE D. E., LOWIN B., PEITSCH M. C., BOTTCHE A., SCHMITZ G., TSCHOPP J. Clusterin (complement lysis inhibitor) forms a high density lipoprotein complex with apolipoprotein A-I in human plasma. *J Biol Chem*, 1991, 266(17), 11030-11036.
- JIALAL I., DEVARAJ S., KAUR H., ADAMS-HUET B., BREMER A. A. Increased chemerin and decreased omentin-1 in both adipose tissue and plasma in nascent metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013, 98(3), E514-517.
- JIANG G., ZHANG B. B. Modulation of insulin signalling by insulin sensitizers. *Biochem Soc Trans*, 2005, 33(Pt 2), 358-361.

- JONES S. A., HORIUCHI S., TOPLEY N., YAMAMOTO N., FULLER G. M. The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease. *FASEB J*, 2001, 15(1), 43-58.
- JUAN ZHU H., PAN H., CUI Y., QING WANG X., JIE WANG L., SHI LI N., BO YANG H., YING GONG F. The Changes of Serum Glypican4 in Obese Patients with Different Glucose Metabolism Status. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014, jc20142018.
- JUUTILAINEN A., LEHTO S., RONNEMAA T., PYORALA K., LAAKSO M. Type 2 diabetes as a "coronary heart disease equivalent": an 18-year prospective population-based study in Finnish subjects. *Diabetes Care*, 2005, 28(12), 2901-2907.
- KAHN B. B. Dietary regulation of glucose transporter gene expression: tissue specific effects in adipose cells and muscle. *J Nutr*, 1994, 124(8 Suppl), 1289S-1295S.
- KALANTAR-ZADEH K., BLOCK G., HORWICH T., FONAROW G. C. Reverse epidemiology of conventional cardiovascular risk factors in patients with chronic heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*, 2004, 43(8), 1439-1444.
- KAMEI N., TOBE K., SUZUKI R., OHSUGI M., WATANABE T., KUBOTA N., OHTSUKA-KOWATARI N., KUMAGAI K., SAKAMOTO K., KOBAYASHI M., YAMAUCHI T., UEKI K., OISHI Y., NISHIMURA S., MANABE I., HASHIMOTO H., OHNISHI Y., OGATA H., TOKUYAMA K., TSUNODA M., IDE T., MURAKAMI K., NAGAI R., KADOWAKI T. Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J Biol Chem*, 2006, 281(36), 26602-26614.
- KANDA H., TATEYA S., TAMORI Y., KOTANI K., HIASA K., KITAZAWA R., KITAZAWA S., MIYACHI H., MAEDA S., EGASHIRA K., KASUGA M. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest*, 2006, 116(6), 1494-1505.
- KANG S. G., BROWN A. L., CHUNG J. H. Oxygen tension regulates the stability of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) through caspase-mediated cleavage. *J Biol Chem*, 2007, 282(9), 6090-6097.
- KARIHALOO A., KALE S., ROSENBLUM N. D., CANTLEY L. G. Hepatocyte growth factor-mediated renal epithelial branching morphogenesis is regulated by glypican-4 expression. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(19), 8745-8752.
- KARUMANCHI S. A., JHA V., RAMCHANDRAN R., KARIHALOO A., TSIOKAS L., CHAN B., DHANABAL M., HANAI J. I., VENKATARAMAN G., SHRIVER Z., KEISER N., KALLURI R., ZENG H., MUKHOPADHYAY D., CHEN R. L., LANDER A. D., HAGIHARA K., YAMAGUCHI Y., SASISEKHARAN R., CANTLEY L., SUKHATME V. P. Cell surface glypicans are low-affinity endostatin receptors. *Mol Cell*, 2001, 7(4), 811-822.
- KELNER M. J., BAGNELL R. D., UGLIK S. F., MONTROYA M. A., MULLENBACH G. T. Heterologous expression of selenium-dependent glutathione peroxidase affords cellular resistance to paraquat. *Arch Biochem Biophys*, 1995, 323(1), 40-46.
- KERN P. A., RANGANATHAN S., LI C., WOOD L., RANGANATHAN G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2001, 280(5), E745-751.

- KERSHAW E. E., FLIER J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89(6), 2548-2556.
- KHAN T., MUISE E. S., IYENGAR P., WANG Z. V., CHANDALIA M., ABATE N., ZHANG B. B., BONALDO P., CHUA S., SCHERER P. E. Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI. *Mol Cell Biol*, 2009, 29(6), 1575-1591.
- KIM G., KIM G. H., OH G. S., YOON J., KIM H. W., KIM M. S., KIM S. W. SREBP-1c regulates glucose-stimulated hepatic clusterin expression. *Biochemical and biophysical research communications*, 2011a, 408(4), 720-725.
- KIM H., LEE S., KIM H. J., KONG M. H., KIM Y. R., KANG S. H., LEE K., LENG L., LEE B., PARK C. G., KOOK Y., KIM B., BUCALA R. Elevated levels of macrophage migration inhibitory factor in women with metabolic syndrome. *Horm Metab Res*, 2011b, 43(9), 642-645.
- KIM H. J., YOO E. K., KIM J. Y., CHOI Y. K., LEE H. J., KIM J. K., JEOUNG N. H., LEE K. U., PARK I. S., MIN B. H., PARK K. G., LEE C. H., ARONOW B. J., SATA M., LEE I. K. Protective role of clusterin/apolipoprotein J against neointimal hyperplasia via antiproliferative effect on vascular smooth muscle cells and cytoprotective effect on endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(10), 1558-1564.
- KIMURA A., SAKURADA S., OHKUNI H., TODOME Y., KURATA K. Moderate hypothermia delays proinflammatory cytokine production of human peripheral blood mononuclear cells. *Crit Care Med*, 2002, 30(7), 1499-1502.
- KINNALLY K. W., ANTONSSON B. A tale of two mitochondrial channels, MAC and PTP, in apoptosis. *Apoptosis*, 2007, 12(5), 857-868.
- KLIP A., TSAKIRIDIS T., MARETTE A., ORTIZ P. A. Regulation of expression of glucose transporters by glucose: a review of studies in vivo and in cell cultures. *FASEB J*, 1994, 8(1), 43-53.
- KOBAYASHI H., MATSUDA M., FUKUHARA A., KOMURO R., SHIMOMURA I. Dysregulated glutathione metabolism links to impaired insulin action in adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009, 296(6), E1326-1334.
- KOTULAK T., DRAPALOVA J., KOPECKY P., LACINOVA Z., KRAMAR P., RIHA H., NETUKA I., MALY J., HOUSA D., BLAHA J., SVACINA S., HALUZIK M. Increased circulating and epicardial adipose tissue mRNA expression of fibroblast growth factor-21 after cardiac surgery: possible role in postoperative inflammatory response and insulin resistance. *Physiol Res*, 2011, 60(5), 757-767.
- KOUNNAS M. Z., LOUKINOVA E. B., STEFANSSON S., HARMONY J. A., BREWER B. H., STRICKLAND D. K., ARGRAVES W. S. Identification of glycoprotein 330 as an endocytic receptor for apolipoprotein J/clusterin. *J Biol Chem*, 1995, 270(22), 13070-13075.
- KREMEN J., DOLINKOVA M., KRAJICKOVA J., BLAHA J., ANDERLOVA K., LACINOVA Z., HALUZIKOVA D., BOSANSKA L., VOKURKA M., SVACINA S., HALUZIK M. Increased subcutaneous and epicardial adipose tissue production of proinflammatory cytokines in cardiac surgery patients: possible role in postoperative insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006, 91(11), 4620-4627.
- KRISTIANSEN O. P., MANDRUP-POULSEN T. Interleukin-6 and diabetes: the good, the bad, or the indifferent? *Diabetes*, 2005, 54 Suppl 2, S114-124.

- KUJIRAOKA T., HATTORI H., MIWA Y., ISHIHARA M., UENO T., ISHII J., TSUJI M., IWASAKI T., SASAGURI Y., FUJIOKA T., SAITO S., TSUSHIMA M., MARUYAMA T., MILLER I. P., MILLER N. E., EGASHIRA T. Serum apolipoprotein j in health, coronary heart disease and type 2 diabetes mellitus. *J Atheroscler Thromb*, 2006, 13(6), 314-322.
- KUTZLEB C., BUSMANN A., WENDLAND M., MARONDE E. Discovery of novel regulatory peptides by reverse pharmacology: spotlight on chemerin and the RF-amide peptides metastin and QRFP. *Curr Protein Pept Sci*, 2005, 6(3), 265-278.
- KWON M. J., JU T. J., HEO J. Y., KIM Y. W., KIM J. Y., WON K. C., KIM J. R., BAE Y. K., PARK I. S., MIN B. H., LEE I. K., PARK S. Y. Deficiency of clusterin exacerbates high-fat diet-induced insulin resistance in male mice. *Endocrinology*, 2014, 155(6), 2089-2101.
- LÁCHOVÁ J., DAŇKOVÁ Š. Evropské výběrové šetření o zdravotním stavu v ČR - EHIS CR, ÚZIS ČR, Aktuální informace č. 70/2010. 2013.
- LAI WING SUN K., CORREIA J. P., KENNEDY T. E. Netrins: versatile extracellular cues with diverse functions. *Development*, 2011, 138(11), 2153-2169.
- LAINSCAK M., VON HAEHLING S., DOEHNER W., ANKER S. D. The obesity paradox in chronic disease: facts and numbers. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2012, 3(1), 1-4.
- LAMMERT A., KIESS W., BOTTNER A., GLASOW A., KRATZSCH J. Soluble leptin receptor represents the main leptin binding activity in human blood. *Biochemical and biophysical research communications*, 2001, 283(4), 982-988.
- LANDINI L., HONKA M. J., FERRANNINI E., NUUTILA P. Adipose Tissue Oxygenation in Obesity: A Matter of Cardiovascular Risk? *Curr Pharm Des*, 2016, 22(1), 68-76.
- LANN D., LEROITH D. Insulin resistance as the underlying cause for the metabolic syndrome. *Med Clin North Am*, 2007, 91(6), 1063-1077, viii.
- LARSON D. F., HORAK K. Macrophage migration inhibitory factor: controller of systemic inflammation. *Crit Care*, 2006, 10(2), 138.
- LAVIN D. P., WHITE M. F., BRAZIL D. P. IRS proteins and diabetic complications. *Diabetologia*, 2016, 59(11), 2280-2291.
- LEBOVITZ H. E., BANERJI M. A. Point: visceral adiposity is causally related to insulin resistance. *Diabetes Care*, 2005, 28(9), 2322-2325.
- LEE G. H., PROENCA R., MONTEZ J. M., CARROLL K. M., DARVISHZADEH J. G., LEE J. I., FRIEDMAN J. M. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature*, 1996, 379(6566), 632-635.
- LEE J. Y., YE J., GAO Z., YOUN H. S., LEE W. H., ZHAO L., SIZEMORE N., HWANG D. H. Reciprocal modulation of Toll-like receptor-4 signaling pathways involving MyD88 and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT by saturated and polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem*, 2003a, 278(39), 37041-37051.
- LEE S. A., KOH G., CHO S. J., YOO S. Y., CHIN S. O. Correlation of Glypican-4 Level with Basal Active Glucagon-Like Peptide 1 Level in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Endocrinol Metab (Seoul)*, 2016, 31(3), 439-445.
- LEE Y., BERGLUND E. D., YU X., WANG M. Y., EVANS M. R., SCHERER P. E., HOLLAND W. L., CHARRON M. J., ROTH M. G., UNGER R. H. Hyperglycemia in rodent

models of type 2 diabetes requires insulin-resistant alpha cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(36), 13217-13222.

LEE Y. H., GIRAUD J., DAVIS R. J., WHITE M. F. c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. *J Biol Chem*, 2003b, 278(5), 2896-2902.

LEI B., TAN X., CAI H., XU Q., GUO Q. Effect of moderate hypothermia on lipid peroxidation in canine brain tissue after cardiac arrest and resuscitation. *Stroke*, 1994, 25(1), 147-152.

LENG L., METZ C. N., FANG Y., XU J., DONNELLY S., BAUGH J., DELOHERY T., CHEN Y., MITCHELL R. A., BUCALA R. MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J Exp Med*, 2003, 197(11), 1467-1476.

LESKOV K. S., KLOKOV D. Y., LI J., KINSELLA T. J., BOOTHMAN D. A. Synthesis and functional analyses of nuclear clusterin, a cell death protein. *J Biol Chem*, 2003, 278(13), 11590-11600.

LEWIS G. F., VRANIC M., HARLEY P., GIACCA A. Fatty acids mediate the acute extrahepatic effects of insulin on hepatic glucose production in humans. *Diabetes*, 1997, 46(7), 1111-1119.

LIN Q., LEE Y. J., YUN Z. Differentiation arrest by hypoxia. *J Biol Chem*, 2006, 281(41), 30678-30683.

LIU C., KE X., WANG Y., FENG X., LI Q., ZHANG Y., ZHU J., LI Q. The level of netrin-1 is decreased in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus patients. *BMC Endocr Disord*, 2016, 16(1), 33.

LIU L., GU H., ZHAO Y., AN L., YANG J. Glypican 4 may be involved in the adipose tissue redistribution in high-fat feeding C57BL/6J mice with peroxisome proliferators-activated receptor gamma agonist rosiglitazone treatment. *Exp Ther Med*, 2014, 8(6), 1813-1818.

LONGO V. D., ELLERBY L. M., BREDESEN D. E., VALENTINE J. S., GRALLA E. B. Human Bcl-2 reverses survival defects in yeast lacking superoxide dismutase and delays death of wild-type yeast. *J Cell Biol*, 1997, 137(7), 1581-1588.

LORD G. M., MATARESE G., HOWARD J. K., BAKER R. J., BLOOM S. R., LECHLER R. I. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature*, 1998, 394(6696), 897-901.

LUE H., KAPURNIOTU A., FINGERLE-ROWSON G., ROGER T., LENG L., THIELE M., CALANDRA T., BUCALA R., BERNHAGEN J. Rapid and transient activation of the ERK MAPK signalling pathway by macrophage migration inhibitory factor (MIF) and dependence on JAB1/CSN5 and Src kinase activity. *Cell Signal*, 2006, 18(5), 688-703.

LUE H., THIELE M., FRANZ J., DAHL E., SPECKGENS S., LENG L., FINGERLE-ROWSON G., BUCALA R., LUSCHER B., BERNHAGEN J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) promotes cell survival by activation of the Akt pathway and role for CSN5/JAB1 in the control of autocrine MIF activity. *Oncogene*, 2007, 26(35), 5046-5059.

LUMENG C. N., BODZIN J. L., SALTIEL A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*, 2007, 117(1), 175-184.

- MANTOVANI A., SICA A., SOZZANI S., ALLAVENA P., VECCHI A., LOCATI M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology*, 2004, 25(12), 677-686.
- MARUNA P., LINDNER J., KUNSTYR J., PLOCOVA K., HUBACEK J. Plasma prohepcidin as a negative acute phase reactant after large cardiac surgery with a deep hypothermic circulatory arrest. *Physiol Res*, 2009, 58(6), 827-833.
- MASUZAKI H., OGAWA Y., SAGAWA N., HOSODA K., MATSUMOTO T., MISE H., NISHIMURA H., YOSHIMASA Y., TANAKA I., MORI T., NAKAO K. Nonadipose tissue production of leptin: Leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med*, 1997, 3(9), 1029-1033.
- MAURY E., BRICHARD S. M. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol*, 2010, 314(1), 1-16.
- MAXWELL P. H. Hypoxia-inducible factor as a physiological regulator. *Exp Physiol*, 2005, 90(6), 791-797.
- MAZUREK T., ZHANG L., ZALEWSKI A., MANNION J. D., DIEHL J. T., ARAFAT H., SAROV-BLAT L., O'BRIEN S., KEIPER E. A., JOHNSON A. G., MARTIN J., GOLDSTEIN B. J., SHI Y. Human epicardial adipose tissue is a source of inflammatory mediators. *Circulation*, 2003, 108(20), 2460-2466.
- MCLAUGHLIN L., ZHU G., MISTRY M., LEY-EBERT C., STUART W. D., FLORIO C. J., GROEN P. A., WITT S. A., KIMBALL T. R., WITTE D. P., HARMONY J. A., ARONOW B. J. Apolipoprotein J/clusterin limits the severity of murine autoimmune myocarditis. *J Clin Invest*, 2000, 106(9), 1105-1113.
- MEDER W., WENDLAND M., BUSMANN A., KUTZLEB C., SPODSBERG N., JOHN H., RICHTER R., SCHLEUDER D., MEYER M., FORSSMANN W. G. Characterization of human circulating TIG2 as a ligand for the orphan receptor ChemR23. *FEBS letters*, 2003, 555(3), 495-499.
- MILLS G. C. Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J Biol Chem*, 1957, 229(1), 189-197.
- MIROCHNITCHENKO O., PALNITKAR U., PHILBERT M., INOUE M. Thermosensitive phenotype of transgenic mice overproducing human glutathione peroxidases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(18), 8120-8124.
- MITCHELL R. A., LIAO H., CHESNEY J., FINGERLE-ROWSON G., BAUGH J., DAVID J., BUCALA R. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(1), 345-350.
- MOFFATT P., DENIZEAU F. Metallothionein in physiological and physiopathological processes. *Drug metabolism reviews*, 1997, 29(1-2), 261-307.
- MOHAMED-ALI V., GOODRICK S., RAWESH A., KATZ D. R., MILES J. M., YUDKIN J. S., KLEIN S., COPPACK S. W. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997a, 82(12), 4196-4200.
- MOHAMED-ALI V., PINKNEY J. H., PANAHLLOO A., GOODRICK S., COPPACK S. W., YUDKIN J. S. Relationships between plasma leptin and insulin concentrations, but not

insulin resistance, in non-insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus. *Diabet Med*, 1997b, 14(5), 376-380.

MOON Y. S., KIM D. H., SONG D. K. Serum tumor necrosis factor-alpha levels and components of the metabolic syndrome in obese adolescents. *Metabolism*, 2004, 53(7), 863-867.

MORASH B., LI A., MURPHY P. R., WILKINSON M., UR E. Leptin gene expression in the brain and pituitary gland. *Endocrinology*, 1999, 140(12), 5995-5998.

MORETTI R. M., MONTAGNANI MARELLI M., MAI S., CARIBONI A., SCALTRITI M., BETTUZZI S., LIMONTA P. Clusterin isoforms differentially affect growth and motility of prostate cells: possible implications in prostate tumorigenesis. *Cancer Res*, 2007, 67(21), 10325-10333.

MRAZ M., LACINOVA Z., DRAPALOVA J., HALUZIKOVA D., HORINEK A., MATOULEK M., TRACHTA P., KAVALKOVA P., SVACINA S., HALUZIK M. The effect of very-low-calorie diet on mRNA expression of inflammation-related genes in subcutaneous adipose tissue and peripheral monocytes of obese patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011, 96(4), E606-613.

MUECKLER M. Facilitative glucose transporters. *Eur J Biochem*, 1994, 219(3), 713-725.

MUNIYAPPA R., IANTORNO M., QUON M. J. An integrated view of insulin resistance and endothelial dysfunction. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2008, 37(3), 685-711, ix-x.

MURPHY B. J., KIMURA T., SATO B. G., SHI Y., ANDREWS G. K. Metallothionein induction by hypoxia involves cooperative interactions between metal-responsive transcription factor-1 and hypoxia-inducible transcription factor-1alpha. *Mol Cancer Res*, 2008, 6(3), 483-490.

NAKATANI Y., KANETO H., KAWAMORI D., YOSHIUCHI K., HATAZAKI M., MATSUOKA T. A., OZAWA K., OGAWA S., HORI M., YAMASAKI Y., MATSUHISA M. Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes. *J Biol Chem*, 2005, 280(1), 847-851.

NAKAYAMA K., NAKAYAMA K., NEGISHI I., KUIDA K., SAWA H., LOH D. Y. Targeted disruption of Bcl-2 alpha beta in mice: occurrence of gray hair, polycystic kidney disease, and lymphocytopenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91(9), 3700-3704.

NCEP Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*, 2001, 285(19), 2486-2497.

NCEP Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*, 2002, 106(25), 3143-3421.

NGUYEN M. T., SATOH H., FAVELYUKIS S., BABENDURE J. L., IMAMURA T., SBODIO J. I., ZALEVSKY J., DAHIYAT B. I., CHI N. W., OLEFSKY J. M. JNK and tumor necrosis factor-alpha mediate free fatty acid-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, 2005, 280(42), 35361-35371.

O'ROURKE R. W., WHITE A. E., METCALF M. D., OLIVAS A. S., MITRA P., LARISON W. G., CHEANG E. C., VARLAMOV O., CORLESS C. L., ROBERTS C. T., JR., MARKS

- D. L. Hypoxia-induced inflammatory cytokine secretion in human adipose tissue stromovascular cells. *Diabetologia*, 2011, 54(6), 1480-1490.
- OBERBACH A., BLUHER M., WIRTH H., TILL H., KOVACS P., KULLNICK Y., SCHLICHTING N., TOMM J. M., ROLLE-KAMPCZYK U., MURUGAIYAN J., BINDER H., DIETRICH A., VON BERGEN M. Combined proteomic and metabolomic profiling of serum reveals association of the complement system with obesity and identifies novel markers of body fat mass changes. *J Proteome Res*, 2011, 10(10), 4769-4788.
- ODA H., UEMURA T., HARADA Y., IWAI Y., TAKEICHI M. A Drosophila homolog of cadherin associated with armadillo and essential for embryonic cell-cell adhesion. *Dev Biol*, 1994, 165(2), 716-726.
- ODEGAARD J. I., CHAWLA A. Pleiotropic actions of insulin resistance and inflammation in metabolic homeostasis. *Science*, 2013, 339(6116), 172-177.
- OHZATO H., YOSHIKAWA K., NISHIMOTO N., OGATA A., TAGOH H., MONDEN M., GOTOH M., KISHIMOTO T., MORI T. Interleukin-6 as a new indicator of inflammatory status: detection of serum levels of interleukin-6 and C-reactive protein after surgery. *Surgery*, 1992, 111(2), 201-209.
- OUCHI N., KIHARA S., ARITA Y., OKAMOTO Y., MAEDA K., KURIYAMA H., HOTTA K., NISHIDA M., TAKAHASHI M., MURAGUCHI M., OHMOTO Y., NAKAMURA T., YAMASHITA S., FUNAHASHI T., MATSUZAWA Y. Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation*, 2000, 102(11), 1296-1301.
- OUCHI N., PARKER J. L., LUGUS J. J., WALSH K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11(2), 85-97.
- OUWENS D. M., BEKAERT M., LAPAUW B., VAN NIEUWENHOVE Y., LEHR S., HARTWIG S., CALDERS P., KAUFMAN J. M., SELL H., ECKEL J., RUIGE J. B. Chemerin as biomarker for insulin sensitivity in males without typical characteristics of metabolic syndrome. *Arch Physiol Biochem*, 2012, 118(3), 135-138.
- OZCAN U., CAO Q., YILMAZ E., LEE A. H., IWAKOSHI N. N., OZDELEN E., TUNCMAN G., GORGUN C., GLIMCHER L. H., HOTAMISLIGIL G. S. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*, 2004, 306(5695), 457-461.
- PALMITER R. D., FINDLEY S. D., WHITMORE T. E., DURNAM D. M. MT-III, a brain-specific member of the metallothionein gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89(14), 6333-6337.
- PAN D. A., LILLIOJA S., KRIKETOS A. D., MILNER M. R., BAUR L. A., BOGARDUS C., JENKINS A. B., STORLIEN L. H. Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action. *Diabetes*, 1997, 46(6), 983-988.
- PANG C., GAO Z., YIN J., ZHANG J., JIA W., YE J. Macrophage infiltration into adipose tissue may promote angiogenesis for adipose tissue remodeling in obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008, 295(2), E313-322.
- PASARICA M., GOWRONSKA-KOZAK B., BURK D., REMEDIOS I., HYMEL D., GIMBLE J., RAVUSSIN E., BRAY G. A., SMITH S. R. Adipose tissue collagen VI in obesity. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009, 94(12), 5155-5162.

PEDERSON T., RONDINONE C. M. Regulation of proteins involved in insulin signaling pathways in differentiating human adipocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 2000, 276(1), 162-168.

PELIKÁNOVÁ T., BARTOŠ V. *Praktická diabetologie*. Edition ed. Praha: Maxdorf, 2011. 742 p.

PETTERSSON C., KARLSSON H., STAHLMAN M., LARSSON T., FAGERBERG B., LINDAHL M., WIKLUND O., BOREN J., FOGELSTRAND L. LDL-associated apolipoprotein J and lysozyme are associated with atherogenic properties of LDL found in type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *J Intern Med*, 2011, 269(3), 306-321.

POULAKOU M. V., PARASKEVAS K. I., WILSON M. R., ILIOPOULOS D. C., TSIGRIS C., MIKHAILIDIS D. P., PERREA D. Apolipoprotein J and leptin levels in patients with coronary heart disease. *In Vivo*, 2008, 22(4), 537-542.

PRYHUBER G. S., O'BRIEN D. P., BAGGS R., PHIPPS R., HUYCK H., SANZ I., NAHM M. H. Ablation of tumor necrosis factor receptor type I (p55) alters oxygen-induced lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000, 278(5), L1082-1090.

QING M., VAZQUEZ-JIMENEZ J. F., KLOSTERHALFEN B., SIGLER M., SCHUMACHER K., DUCHATEAU J., MESSMER B. J., VON BERNUTH G., SEGHAJE M. C. Influence of temperature during cardiopulmonary bypass on leukocyte activation, cytokine balance, and post-operative organ damage. *Shock*, 2001, 15(5), 372-377.

RAMKHELAWON B., HENNESSY E. J., MENAGER M., RAY T. D., SHEEDY F. J., HUTCHISON S., WANSCHER A., OLDEBEKEN S., GEOFFRION M., SPIRO W., MILLER G., MCPHERSON R., RAYNER K. J., MOORE K. J. Netrin-1 promotes adipose tissue macrophage retention and insulin resistance in obesity. *Nat Med*, 2014, 20(4), 377-384.

RASOULI N., KERN P. A. Adipocytokines and the metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008, 93(11 Suppl 1), S64-73.

RAVUSSIN E., SMITH S. R. Increased fat intake, impaired fat oxidation, and failure of fat cell proliferation result in ectopic fat storage, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus. *Ann N Y Acad Sci*, 2002, 967, 363-378.

REAVEN G. M. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, 1988, 37(12), 1595-1607.

REAVEN G. M., CHEN Y. D., GOLAY A., SWISLOCKI A. L., JASPAN J. B. Documentation of hyperglucagonemia throughout the day in nonobese and obese patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, 1987, 64(1), 106-110.

ROGER T., DAVID J., GLAUSER M. P., CALANDRA T. MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. *Nature*, 2001, 414(6866), 920-924.

ROMERO-CORRAL A., MONTORI V. M., SOMERS V. K., KORINEK J., THOMAS R. J., ALLISON T. G., MOOKADAM F., LOPEZ-JIMENEZ F. Association of bodyweight with total mortality and with cardiovascular events in coronary artery disease: a systematic review of cohort studies. *Lancet*, 2006, 368(9536), 666-678.

RONDINONE C. M., WANG L. M., LONNROTH P., WESSLAU C., PIERCE J. H., SMITH U. Insulin receptor substrate (IRS) 1 is reduced and IRS-2 is the main docking protein for phosphatidylinositol 3-kinase in adipocytes from subjects with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94(8), 4171-4175.

- SAITO T., OTSUKA A., KURASHIMA A., WATANABE M., AOKI S., HARADA A. [Study of lymphocyte and NK cell activity during mild hypothermia therapy]. *No Shinkei Geka*, 2001, 29(7), 633-639.
- SALTIEL A. R., OLEFSKY J. M. Thiazolidinediones in the treatment of insulin resistance and type II diabetes. *Diabetes*, 1996, 45(12), 1661-1669.
- SARTIPY P., LOSKUTOFF D. J. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(12), 7265-7270.
- SAVKOVIC V., GANTZER H., REISER U., SELIG L., GAISER S., SACK U., KLOPPPEL G., MOSSNER J., KEIM V., HORN F., BODEKER H. Clusterin is protective in pancreatitis through anti-apoptotic and anti-inflammatory properties. *Biochemical and biophysical research communications*, 2007, 356(2), 431-437.
- SELL H., DIETZE-SCHROEDER D., KAISER U., ECKEL J. Monocyte chemotactic protein-1 is a potential player in the negative cross-talk between adipose tissue and skeletal muscle. *Endocrinology*, 2006, 147(5), 2458-2467.
- SEMENZA G. L. HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes Dev*, 2000, 14(16), 1983-1991.
- SESSLER D. I. Complications and treatment of mild hypothermia. *Anesthesiology*, 2001, 95(2), 531-543.
- SESSLER D. I., MCGUIRE J., MOAYERI A., HYNESON J. Isoflurane-induced vasodilation minimally increases cutaneous heat loss. *Anesthesiology*, 1991, 74(2), 226-232.
- SESTI G., FEDERICI M., HRIBAL M. L., LAURO D., SBRACCIA P., LAURO R. Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders. *FASEB J*, 2001, 15(12), 2099-2111.
- SETHI J. K., VIDAL-PUIG A. J. Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J Lipid Res*, 2007, 48(6), 1253-1262.
- SEWTER C. P., DIGBY J. E., BLOWS F., PRINS J., O'RAHILLY S. Regulation of tumour necrosis factor- α release from human adipose tissue in vitro. *J Endocrinol*, 1999, 163(1), 33-38.
- SHAN Z. X., LIN Q. X., DENG C. Y., TAN H. H., KUANG S. J., XIAO D. Z., ZHU J. N., FU Y. H., YU X. Y. [Identification of the interactions between the truncated fragments of macrophage migration inhibitory factor and CD74 using a yeast two-hybrid system]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2009, 29(12), 2383-2386, 2390.
- SHI H., KOKOEVA M. V., INOUE K., TZAMELI I., YIN H., FLIER J. S. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest*, 2006a, 116(11), 3015-3025.
- SHI X., LENG L., WANG T., WANG W., DU X., LI J., MCDONALD C., CHEN Z., MURPHY J. W., LOLIS E., NOBLE P., KNUDSON W., BUCALA R. CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex. *Immunity*, 2006b, 25(4), 595-606.
- SHIM Y. J., KANG B. H., CHOI B. K., PARK I. S., MIN B. H. Clusterin induces the secretion of TNF- α and the chemotactic migration of macrophages. *Biochemical and biophysical research communications*, 2012, 422(1), 200-205.

SHIMOMURA I., FUNAHASHI T., TAKAHASHI M., MAEDA K., KOTANI K., NAKAMURA T., YAMASHITA S., MIURA M., FUKUDA Y., TAKEMURA K., TOKUNAGA K., MATSUZAWA Y. Enhanced expression of PAI-1 in visceral fat: Possible contributor to vascular disease in obesity. *Nat Med*, 1996, 2(7), 800-803.

SHULMAN G. I. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest*, 2000, 106(2), 171-176.

SCHROEDER R., GARRISON J. M., JR., JOHNSON M. S. Treatment of adult obesity with bariatric surgery. *Am Fam Physician*, 2011, 84(7), 805-814.

SCHWARTZ V., LUE H., KRAEMER S., KORBIEL J., KROHN R., OHL K., BUCALA R., WEBER C., BERNHAGEN J. A functional heteromeric MIF receptor formed by CD74 and CXCR4. *FEBS letters*, 2009, 583(17), 2749-2757.

SIEBERTZ B., STOCKER G., DRZENIEK Z., HANDT S., JUST U., HAUBECK H. D. Expression of glypican-4 in haematopoietic-progenitor and bone-marrow-stromal cells. *Biochem J*, 1999, 344 Pt 3, 937-943.

SINHA M. K., OPENTANOVA I., OHANNESIAN J. P., KOLACZYNSKI J. W., HEIMAN M. L., HALE J., BECKER G. W., BOWSHER R. R., STEPHENS T. W., CARO J. F. Evidence of free and bound leptin in human circulation - Studies in lean and obese subjects and during short-term fasting. *Journal of Clinical Investigation*, 1996, 98(6), 1277-1282.

SKURK T., ALBERTI-HUBER C., HERDER C., HAUNER H. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007, 92(3), 1023-1033.

SKURK T., HERDER C., KRAFT I., MULLER-SCHOLZE S., HAUNER H., KOLB H. Production and release of macrophage migration inhibitory factor from human adipocytes. *Endocrinology*, 2005, 146(3), 1006-1011.

SMITH T. G., ROBBINS P. A., RATCLIFFE P. J. The human side of hypoxia-inducible factor. *Br J Haematol*, 2008, 141(3), 325-334.

SOLAŘ M. Léčebná hypotermie u nemocných po srdeční zástavě. *Interv. Akut. Kardiol.*, 2004, 3, 192-195.

SONG F., POLJAK A., CRAWFORD J., KOCHAN N. A., WEN W., CAMERON B., LUX O., BRODATY H., MATHER K., SMYTHE G. A., SACHDEV P. S. Plasma apolipoprotein levels are associated with cognitive status and decline in a community cohort of older individuals. *PLoS One*, 2012, 7(6), e34078.

SONG M. J., KIM K. H., YOON J. M., KIM J. B. Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 2006, 346(3), 739-745.

SPALDING K. L., ARNER E., WESTERMARK P. O., BERNARD S., BUCHHOLZ B. A., BERGMANN O., BLOMQVIST L., HOFFSTEDT J., NASLUND E., BRITTON T., CONCHA H., HASSAN M., RYDEN M., FRISEN J., ARNER P. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*, 2008, 453(7196), 783-787.

SPIEGELMAN B. M. Banting Lecture 2012: Regulation of adipogenesis: toward new therapeutics for metabolic disease. *Diabetes*, 2013, 62(6), 1774-1782.

STARLETS D., GORE Y., BINSKY I., HARAN M., HARPAZ N., SHVIDEL L., BECKER-HERMAN S., BERREBI A., SHACHAR I. Cell-surface CD74 initiates a signaling cascade leading to cell proliferation and survival. *Blood*, 2006, 107(12), 4807-4816.

STERN M. P., WILLIAMS K., GONZALEZ-VILLALPANDO C., HUNT K. J., HAFFNER S. M. Does the metabolic syndrome improve identification of individuals at risk of type 2 diabetes and/or cardiovascular disease? *Diabetes Care*, 2004, 27(11), 2676-2681.

STRISSEL K. J., STANCHEVA Z., MIYOSHI H., PERFIELD J. W., 2ND, DEFURIA J., JICK Z., GREENBERG A. S., OBIN M. S. Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes*, 2007, 56(12), 2910-2918.

SUGANAMI T., TANIMOTO-KOYAMA K., NISHIDA J., ITOH M., YUAN X., MIZUARAI S., KOTANI H., YAMAOKA S., MIYAKE K., AOE S., KAMEI Y., OGAWA Y. Role of the Toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(1), 84-91.

SZABLEWSKI L. Glucose transporters in healthy heart and in cardiac disease. *Int J Cardiol*, 2016.

SZROK S., STELMANSKA E., TURYN J., BIELICKA-GIELDON A., SLEDZINSKI T., SWIERCZYNSKI J. Metallothioneins 1 and 2, but not 3, are regulated by nutritional status in rat white adipose tissue. *Genes Nutr*, 2016, 11, 18.

TAKASE O., MINTO A. W., PURI T. S., CUNNINGHAM P. N., JACOB A., HAYASHI M., QUIGG R. J. Inhibition of NF-kappaB-dependent Bcl-xL expression by clusterin promotes albumin-induced tubular cell apoptosis. *Kidney international*, 2008, 73(5), 567-577.

TAKEDA K., KAISHO T., AKIRA S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*, 2003, 21, 335-376.

TAM C. S., COVINGTON J. D., RAVUSSIN E., REDMAN L. M., PENNINGTON C. T. Little evidence of systemic and adipose tissue inflammation in overweight individuals(dagger). *Front Genet*, 2012, 3, 58.

TAMORI Y., KASUGA M. Glypican-4 is a new comer of adipokines working as insulin sensitizer. *J Diabetes Investig*, 2013, 4(3), 250-251.

TAN B. K., CHEN J., FARHATULLAH S., ADYA R., KAUR J., HEUTLING D., LEWANDOWSKI K. C., O'HARE J. P., LEHNERT H., RANDEVA H. S. Insulin and metformin regulate circulating and adipose tissue chemerin. *Diabetes*, 2009, 58(9), 1971-1977.

TARTAGLIA L. A., DEMBSKI M., WENG X., DENG N. H., CULPEPPER J., DEVOS R., RICHARDS G. J., CAMPFIELD L. A., CLARK F. T., DEEDS J., MUIR C., SANKER S., MORIARTY A., MOORE K. J., SMUTKO J. S., MAYS G. G., WOLF E. A., MONROE C. A., TEPPER R. I. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*, 1995, 83(7), 1263-1271.

TAYLOR S. D., DAVENPORT L. D., SPERANZA M. J., MULLENBACH G. T., LYNCH R. E. Glutathione peroxidase protects cultured mammalian cells from the toxicity of adriamycin and paraquat. *Arch Biochem Biophys*, 1993, 305(2), 600-605.

TINAHONES F. J., COIN ARAGUEZ L., MURRI M., OLIVA OLIVERA W., MAYAS TORRES M. D., BARBARROJA N., GOMEZ HUEL GAS R., MALAGON M. M., EL

BEKAY R. Caspase induction and BCL2 inhibition in human adipose tissue: a potential relationship with insulin signaling alteration. *Diabetes Care*, 2013, 36(3), 513-521.

TOUSKOVA V., TRACHTA P., KAVALKOVA P., DRAPALOVA J., HALUZIKOVA D., MRAZ M., LACINOVA Z., MAREK J., HALUZIK M. Serum concentrations and tissue expression of components of insulin-like growth factor-axis in females with type 2 diabetes mellitus and obesity: the influence of very-low-calorie diet. *Mol Cell Endocrinol*, 2012, 361(1-2), 172-178.

TRACHTA P., DOSTALOVA I., HALUZIKOVA D., KASALICKY M., KAVALKOVA P., DRAPALOVA J., URBANOVA M., LACINOVA Z., MRAZ M., HALUZIK M. Laparoscopic sleeve gastrectomy ameliorates mRNA expression of inflammation-related genes in subcutaneous adipose tissue but not in peripheral monocytes of obese patients. *Mol Cell Endocrinol*, 2014, 383(1-2), 96-102.

TRAN T. T., YAMAMOTO Y., GESTA S., KAHN C. R. Beneficial effects of subcutaneous fat transplantation on metabolism. *Cell Metab*, 2008, 7(5), 410-420.

TRAYHURN P., WOOD I. S. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr*, 2004, 92(3), 347-355.

TROUGAKOS I. P., GONOS E. S. Clusterin/apolipoprotein J in human aging and cancer. *Int J Biochem Cell Biol*, 2002, 34(11), 1430-1448.

TROUGAKOS I. P., POULAKOU M., STATHATOS M., CHALIKIA A., MELIDONIS A., GONOS E. S. Serum levels of the senescence biomarker clusterin/apolipoprotein J increase significantly in diabetes type II and during development of coronary heart disease or at myocardial infarction. *Exp Gerontol*, 2002, 37(10-11), 1175-1187.

TSUKUMO D. M., CARVALHO-FILHO M. A., CARVALHEIRA J. B., PRADA P. O., HIRABARA S. M., SCHENKA A. A., ARAUJO E. P., VASSALLO J., CURI R., VELLOSO L. A., SAAD M. J. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes*, 2007, 56(8), 1986-1998.

TSUKUMO D. M., CARVALHO-FILHO M. A., CARVALHEIRA J. B., PRADA P. O., HIRABARA S. M., SCHENKA A. A., ARAUJO E. P., VASSALLO J., CURI R., VELLOSO L. A., SAAD M. J. Statement of Retraction. Loss-of-Function Mutation in Toll-Like Receptor 4 Prevents Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes* 2007;56:1986-1998. DOI: 10.2337/db06-1595. *Diabetes*, 2016, 65(4), 1126-1127.

TURNBAUGH P. J., HAMADY M., YATSUNENKO T., CANTAREL B. L., DUNCAN A., LEY R. E., SOGIN M. L., JONES W. J., ROE B. A., AFFOURTIT J. P., EGHOLM M., HENRISSAT B., HEATH A. C., KNIGHT R., GORDON J. I. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, 2009, 457(7228), 480-484.

UNGER R. H., ORCI L. Diseases of liporegulation: new perspective on obesity and related disorders. *FASEB J*, 2001, 15(2), 312-321.

URBANOVA M., DOSTALOVA I., TRACHTA P., DRAPALOVA J., KAVALKOVA P., HALUZIKOVA D., MATOULEK M., LACINOVA Z., MRAZ M., KASALICKY M., HALUZIK M. Serum concentrations and subcutaneous adipose tissue mRNA expression of omentin in morbid obesity and type 2 diabetes mellitus: the effect of very-low-calorie diet, physical activity and laparoscopic sleeve gastrectomy. *Physiol Res*, 2014, 63(2), 207-218.

URETSKY S., MESSERLI F. H., BANGALORE S., CHAMPION A., COOPER-DEHOFF R. M., ZHOU Q., PEPINE C. J. Obesity paradox in patients with hypertension and coronary artery disease. *Am J Med*, 2007, 120(10), 863-870.

USSAR S., BEZY O., BLUHER M., KAHN C. R. Glypican-4 enhances insulin signaling via interaction with the insulin receptor and serves as a novel adipokine. *Diabetes*, 2012, 61(9), 2289-2298.

ÚZIS. Činnost oboru diabetologie, péče o diabetiky v roce 2013. In Ú.Z.I.A.S.Č. REPUBLIKY. *Aktuální informace č. 2/2015*. 2015.

WAJANT H., PFIZENMAIER K., SCHEURICH P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*, 2003, 10(1), 45-65.

WAJCHENBERG B. L., GIANNELLA-NETO D., DA SILVA M. E., SANTOS R. F. Depot-specific hormonal characteristics of subcutaneous and visceral adipose tissue and their relation to the metabolic syndrome. *Horm Metab Res*, 2002, 34(11-12), 616-621.

WANG B., WOOD I. S., TRAYHURN P. Dysregulation of the expression and secretion of inflammation-related adipokines by hypoxia in human adipocytes. *Pflugers Arch*, 2007, 455(3), 479-492.

WANG B., WOOD I. S., TRAYHURN P. PCR arrays identify metallothionein-3 as a highly hypoxia-inducible gene in human adipocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 2008a, 368(1), 88-93.

WANG B., WOOD I. S., TRAYHURN P. PCR arrays identify metallothionein-3 as a highly hypoxia-inducible gene in human adipocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 2008b, 368(1), 88-93.

WANG G. L., JIANG B. H., RUE E. A., SEMENZA G. L. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(12), 5510-5514.

WATTS S. W., DORRANCE A. M., PENFOLD M. E., ROURKE J. L., SINAL C. J., SEITZ B., SULLIVAN T. J., CHARVAT T. T., THOMPSON J. M., BURNETT R., FINK G. D. Chemerin connects fat to arterial contraction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(6), 1320-1328.

WEISBERG S. P., MCCANN D., DESAI M., ROSENBAUM M., LEIBEL R. L., FERRANTE A. W., JR. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*, 2003, 112(12), 1796-1808.

WEISS B., STOFFEL W. Human and murine serine-palmitoyl-CoA transferase--cloning, expression and characterization of the key enzyme in sphingolipid synthesis. *Eur J Biochem*, 1997, 249(1), 239-247.

WELLEN K. E., HOTAMISLIGIL G. S. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest*, 2003, 112(12), 1785-1788.

WHITE J. J., MOHAMED R., JAYAKUMAR C., RAMESH G. Tubular injury marker netrin-1 is elevated early in experimental diabetes. *J Nephrol*, 2013, 26(6), 1055-1064.

WHO. Obesity and overweight - Fact sheet
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. In.

WIESENTHAL S. R., SANDHU H., MCCALL R. H., TCHIPASHVILI V., YOSHII H., POLONSKY K., SHI Z. Q., LEWIS G. F., MARI A., GIACCA A. Free fatty acids impair hepatic insulin extraction in vivo. *Diabetes*, 1999, 48(4), 766-774.

WILLIAMS G. R., JR., SPENCER F. C. The clinical use of hypothermia following cardiac arrest. *Ann Surg*, 1958, 148(3), 462-468.

WILSON B. D., II M., PARK K. W., SULI A., SORENSSEN L. K., LARRIEU-LAHARGUE F., URNESS L. D., SUH W., ASAI J., KOCK G. A., THORNE T., SILVER M., THOMAS K. R., CHIEN C. B., LOSORDO D. W., LI D. Y. Netrins promote developmental and therapeutic angiogenesis. *Science*, 2006, 313(5787), 640-644.

WON J. C., PARK C. Y., OH S. W., LEE E. S., YOUN B. S., KIM M. S. Plasma clusterin (ApoJ) levels are associated with adiposity and systemic inflammation. *PLoS One*, 2014, 9(7), e103351.

WOOD I. S., TRAYHURN P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr*, 2003, 89(1), 3-9.

WOOD I. S., WANG B., LORENTE-CEBRIAN S., TRAYHURN P. Hypoxia increases expression of selective facilitative glucose transporters (GLUT) and 2-deoxy-D-glucose uptake in human adipocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 2007, 361(2), 468-473.

XING Z., GAULDIE J., COX G., BAUMANN H., JORDANA M., LEI X. F., ACHONG M. K. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest*, 1998, 101(2), 311-320.

XU H., BARNES G. T., YANG Q., TAN G., YANG D., CHOU C. J., SOLE J., NICHOLS A., ROSS J. S., TARTAGLIA L. A., CHEN H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*, 2003, 112(12), 1821-1830.

YABUNAKA N., NISHIHIRA J., MIZUE Y., TSUJI M., KUMAGAI M., OHTSUKA Y., IMAMURA M., ASAKA M. Elevated serum content of macrophage migration inhibitory factor in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 2000, 23(2), 256-258.

YANG Y. H., SZABAT M., BRAGAGNINI C., KOTT K., HELGASON C. D., HOFFMAN B. G., JOHNSON J. D. Paracrine signalling loops in adult human and mouse pancreatic islets: netrins modulate beta cell apoptosis signalling via dependence receptors. *Diabetologia*, 2011, 54(4), 828-842.

YE J., GAO Z., YIN J., HE Q. Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007, 293(4), E1118-1128.

YE J., MCGUINNESS O. P. Inflammation during obesity is not all bad: evidence from animal and human studies. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2013, 304(5), E466-477.

YEBRA M., MONTGOMERY A. M., DIAFERIA G. R., KAIDO T., SILLETTI S., PEREZ B., JUST M. L., HILDBRAND S., HURFORD R., FLORKIEWICZ E., TESSIER-LAVIGNE M., CIRULLI V. Recognition of the neural chemoattractant Netrin-1 by integrins alpha6beta4 and alpha3beta1 regulates epithelial cell adhesion and migration. *Dev Cell*, 2003, 5(5), 695-707.

- YENARI M. A., HEMMEN T. M. Therapeutic hypothermia for brain ischemia: where have we come and where do we go? *Stroke*, 2010, 41(10 Suppl), S72-74.
- YEOP HAN C., KARGI A. Y., OMER M., CHAN C. K., WABITSCH M., O'BRIEN K. D., WIGHT T. N., CHAIT A. Differential effect of saturated and unsaturated free fatty acids on the generation of monocyte adhesion and chemotactic factors by adipocytes: dissociation of adipocyte hypertrophy from inflammation. *Diabetes*, 2010, 59(2), 386-396.
- YOO H. J., HWANG S. Y., CHO G. J., HONG H. C., CHOI H. Y., HWANG T. G., KIM S. M., BLUHER M., YOUN B. S., BAIK S. H., CHOI K. M. Association of glypican-4 with body fat distribution, insulin resistance, and nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013, 98(7), 2897-2901.
- YOU H. J., LEE K. J., JEONG H. G. Overexpression of human metallothionein-III prevents hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human fibroblasts. *FEBS letters*, 2002, 521(1-3), 175-179.
- YU C., CHEN Y., CLINE G. W., ZHANG D., ZONG H., WANG Y., BERGERON R., KIM J. K., CUSHMAN S. W., COONEY G. J., ATCHESON B., WHITE M. F., KRAEGEN E. W., SHULMAN G. I. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem*, 2002, 277(52), 50230-50236.
- YU F., WHITE S. B., ZHAO Q., LEE F. S. HIF-1 α binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(17), 9630-9635.
- ZACHARIASSEN K. E. Hypothermia and cellular physiology. *Arctic Med Res*, 1991, 50 Suppl 6, 13-17.
- ZAMZAMI N., BRENNER C., MARZO I., SUSIN S. A., KROEMER G. Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins. *Oncogene*, 1998, 16(17), 2265-2282.
- ZHANG H., KIM J. K., EDWARDS C. A., XU Z., TAICHMAN R., WANG C. Y. Clusterin inhibits apoptosis by interacting with activated Bax. *Nat Cell Biol*, 2005, 7(9), 909-915.
- ZHANG Y., PROENCA R., MAFFEI M., BARONE M., LEOPOLD L., FRIEDMAN J. M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 1994, 372(6505), 425-432.
- ZHAO L., MAO Z., WOODY S. K., BRINTON R. D. Sex differences in metabolic aging of the brain: insights into female susceptibility to Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 2016, 42, 69-79.
- ZHAO W., KATZMARZYK P. T., HORSWELL R., WANG Y., LI W., JOHNSON J., HEYMSFIELD S. B., CEFALU W. T., RYAN D. H., HU G. Body mass index and the risk of all-cause mortality among patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation*, 2014, 130(24), 2143-2151.
- ŽÁK A., SLABÝ A. Ke koncepci metabolického syndromu. *Čas Lék čes*, 2009, 148: 536–543.

12. Přílohy

12.1. Seznam publikovaných článků a abstrakt

12.1.1. Publikace in extenso, které jsou podkladem dizertace

a. Publikace v časopisech s IF

- **DRAPALOVA J.**, KOPECKY P., BARTLOVA M., LACINOVA Z., NOVAK D., MARUNA P., LIPS M., MRAZ M., LINDNER J., HALUZIK M. The influence of deep hypothermia on inflammatory status, tissue hypoxia and endocrine function of adipose tissue during cardiac surgery. *Cryobiology*, 2014, 68(2), 269-275. IF: 1,920
- **KLOUCKOVA J.**, LACINOVA Z., KAVALKOVA P., TRACHTA P., KASALICKY M., HALUZIKOVA D., MRAZ M., HALUZIK M. Plasma concentrations and subcutaneous adipose tissue mRNA expression of clusterin in obesity and type 2 diabetes mellitus: the effect of short-term hyperinsulinemia, very-low-calorie diet and bariatric surgery. *Physiol Res*, 2016, 65(3), 481-492. IF: 1,643

b. Abstrakta přednášek

- **DRAPALOVA J.**, KAVALKOVA P., BARTLOVA M., KOPECKY P., KOTULAK T., HALUZIK M. 2011. The influence of deep hypothermia on the endocrine function of adipose tissue. In *Proceedings of the Febs Journal*, Jun 2011, 177-177. 47th EASD Annual Meeting – Lisbon, Portugal
- **DRÁPALOVÁ J.**, URBANOVÁ M., TRACHTA P., MRÁZ M., KAVÁLKOVÁ P., HALUZÍK M. 2012. Sérové koncentrace a genová exprese nového metabolického faktoru clusterinu u pacientů s obezitou a diabetes mellitus 2. typu: vliv nízkokalorické diety. In *Proceedings of the 13. Studená vědecká konference*, 10.5.2012 - Praha.

12.1.2. Publikace in extenso bez vztahu k tématu dizertace

a. Publikace v časopisech s IF

- KOTULAK T., **DRAPALOVA J.**, KOPECKY P., LACINOVA Z., KRAMAR P., RIHA H., NETUKA I., MALY J., HOUSA D., BLAHA J., SVACINA S., HALUZIK M. Increased circulating and epicardial adipose tissue mRNA expression of fibroblast growth factor-21 after cardiac surgery: possible role in postoperative inflammatory response and insulin resistance. *Physiol Res*, 2011, 60(5), 757-767. IF: 1,643
- MALETINSKA L., MATYSKOVA R., MAIXNEROVA J., SYKORA D., PYCHOVA M., SPOLCOVA A., BLECHOVA M., **DRAPALOVA J.**, LACINOVA Z., HALUZIK M., ZELEDNA B. The Peptidic GHS-R antagonist [D-Lys(3)]GHRP-6 markedly improves adiposity and related metabolic abnormalities in a mouse model of postmenopausal obesity. *Mol Cell Endocrinol*, 2011, 343(1-2), 55-62. IF: 3,859
- MRAZ M., LACINOVA Z., **DRAPALOVA J.**, HALUZIKOVA D., HORINEK A., MATOULEK M., TRACHTA P., KAVALKOVA P., SVACINA S., HALUZIK M. The effect of very-low-calorie diet on mRNA expression of inflammation-related genes in subcutaneous adipose tissue and peripheral monocytes of obese patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011, 96(4), E606-613. IF: 5,531

- MRAZ M., LACINOVA Z., KAVALKOVA P., HALUZIKOVA D., TRACHTA P., **DRAPALOVA J.**, HANUSOVA V., HALUZIK M. Serum concentrations of fibroblast growth factor 19 in patients with obesity and type 2 diabetes mellitus: the influence of acute hyperinsulinemia, very-low calorie diet and PPAR-alpha agonist treatment. *Physiol Res*, 2011, 60(4), 627-636. IF: 1,643
- MALETINSKA L., MATYSKOVA R., MAIXNEROVA J., SYKORA D., PYCHOVA M., SPOLCOVA A., BLECHOVA M., **DRAPALOVA J.**, LACINOVA Z., HALUZIK M., ZELEZNA B. The peptidic GHS-R antagonist [D-Lys3]GHRP-6 markedly improves adiposity and related metabolic abnormalities in a mouse model of postmenopausal obesity (vol 343, pg 55, 2011). *Mol Cell Endocrinol*, 2012, 348(1), 344-344. IF: 3,859
- TOUSKOVA V., TRACHTA P., KAVALKOVA P., **DRAPALOVA J.**, HALUZIKOVA D., MRAZ M., LACINOVA Z., MAREK J., HALUZIK M. Serum concentrations and tissue expression of components of insulin-like growth factor-axis in females with type 2 diabetes mellitus and obesity: the influence of very-low-calorie diet. *Mol Cell Endocrinol*, 2012, 361(1-2), 172-178. IF: 3,859
- HALUZIKOVA D., LACINOVA Z., KAVALKOVA P., **DRAPALOVA J.**, KRIZOVA J., BARTLOVA M., MRAZ M., PETR T., VITEK L., KASALICKY M., HALUZIK M. Laparoscopic sleeve gastrectomy differentially affects serum concentrations of FGF-19 and FGF-21 in morbidly obese subjects. *Obesity (Silver Spring)*, 2013, 21(7), 1335-1342. IF: 3,614
- HOLUBOVA M., SPOLCOVA A., DEMIANOVA Z., SYKORA D., FEHRENTZ J. A., MARTINEZ J., STOFKOVA A., JURCOVICOVA J., **DRAPALOVA J.**, LACINOVA Z., HALUZIK M., ZELEZNA B., MALETINSKA L. Ghrelin agonist JMV 1843 increases food intake, body weight and expression of orexigenic neuropeptides in mice. *Physiol Res*, 2013, 62(4), 435-444. IF: 1,643
- KAVALKOVA P., TOUSKOVA V., ROUBICEK T., TRACHTA P., URBANOVA M., **DRAPALOVA J.**, HALUZIKOVA D., MRAZ M., NOVAK D., MATOULEK M., LACINOVA Z., HALUZIK M. Serum preadipocyte factor-1 concentrations in females with obesity and type 2 diabetes mellitus: the influence of very low calorie diet, acute hyperinsulinemia, and fenofibrate treatment. *Horm Metab Res*, 2013, 45(11), 820-826. IF: 2,029
- MORENO-NAVARRETE J. M., TOUSKOVA V., SABATER M., MRAZ M., **DRAPALOVA J.**, ORTEGA F., SERRANO M., CATALAN V., GOMEZ-AMBROSI J., ORTIZ M. R., PARDO G., PUEYO N., RICART W., LACINOVA Z., HALUZIK M., FRUHBECK G., FERNANDEZ-REAL J. M. Liver, but not adipose tissue PEDF gene expression is associated with insulin resistance. *Int J Obes (Lond)*, 2013, 37(9), 1230-1237. IF: 5,337
- RACIL Z., RAZGA F., **DRAPALOVA J.**, BURESOVA L., ZACKOVA D., PALACKOVA M., SEMERAD L., MALASKOVA L., HALUZIK M., MAYER J. Mechanism of impaired glucose metabolism during nilotinib therapy in patients with chronic myelogenous leukemia. *Haematologica*, 2013, 98(10), e124-126. IF: 6,671
- KOTULAK T., **DRAPALOVA J.**, LIPS M., LACINOVA Z., KRAMAR P., RIHA H., NETUKA I., MALY J., BLAHA J., LINDNER J., SVACINA S., MRAZ M., HALUZIK M. Cardiac surgery increases serum concentrations of adipocyte fatty acid-binding protein

and its mRNA expression in circulating monocytes but not in adipose tissue. *Physiol Res*, 2014, 63(1), 83-94. IF: 1,643

- TRACHTA P., DOSTALOVA I., HALUZIKOVA D., KASALICKY M., KAVALKOVA P., **DRAPALOVA J.**, URBANOVA M., LACINOVA Z., MRAZ M., HALUZIK M. Laparoscopic sleeve gastrectomy ameliorates mRNA expression of inflammation-related genes in subcutaneous adipose tissue but not in peripheral monocytes of obese patients. *Mol Cell Endocrinol*, 2014, 383(1-2), 96-102. IF: 3,859
- TRACHTA P., **DRAPALOVA J.**, KAVALKOVA P., TOUSKOVA V., CINKAJZLOVA A., LACINOVA Z., MATOULEK M., ZELINKA T., WIDIMSKY J., JR., MRAZ M., HALUZIK M. Three months of regular aerobic exercise in patients with obesity improve systemic subclinical inflammation without major influence on blood pressure and endocrine production of subcutaneous fat. *Physiol Res*, 2014, 63 Suppl 2, S299-308. IF: 1,643
- URBANOVA M., DOSTALOVA I., TRACHTA P., **DRAPALOVA J.**, KAVALKOVA P., HALUZIKOVA D., MATOULEK M., LACINOVA Z., MRAZ M., KASALICKY M., HALUZIK M. Serum concentrations and subcutaneous adipose tissue mRNA expression of omentin in morbid obesity and type 2 diabetes mellitus: the effect of very-low-calorie diet, physical activity and laparoscopic sleeve gastrectomy. *Physiol Res*, 2014, 63(2), 207-218. IF: 1,643
- FUCIKOVA J., TRUXOVA I., HENSLER M., BECHT E., KASIKOVA L., MOSEROVA I., VOSAHLIKOVA S., **KLOUCKOVA J.**, CHURCH S. E., CREMER I., KEPP O., KROEMER G., GALLUZZI L., SALEK C., SPISEK R. Calreticulin exposure by malignant blasts correlates with robust anticancer immunity and improved clinical outcome in AML patients. *Blood*, 2016, 128(26), 3113-3124. IF: 11,847
- KAVALKOVA P., MRAZ M., TRACHTA P., **KLOUCKOVA J.**, CINKAJZLOVA A., LACINOVA Z., HALUZIKOVA D., BENES M., VLASAKOVA Z., BURDA V., NOVAK D., PETR T., VITEK L., PELIKANNOVA T., HALUZIK M. Endocrine effects of duodenal-jejunal exclusion in obese patients with type 2 diabetes mellitus. *J Endocrinol*, 2016, 231(1), 11-22. IF: 4,498
- MACAKOVA M., BOHUSLAVOVA B., VOCHOZKOVA P., PAVLOK A., SEDLACKOVA M., VIDINSKA D., VOCHYANOVA K., LISKOVA I., VALEKOVA I., BAXA M., ELLEDEROVA Z., KLIMA J., JUHAS S., JUHASOVA J., **KLOUCKOVA J.**, HALUZIK M., KLEMPER J., HANSIKOVA H., SPACILOVA J., COLLINS R., BLUMENTHAL I., TALKOWSKI M., GUSELLA J. F., HOWLAND D. S., DIFIGLIA M., MOTLIK J. Mutated Huntingtin Causes Testicular Pathology in Transgenic Minipig Boars. *Neurodegener Dis*, 2016, 16(3-4), 245-259. IF: 2,937
- TOUSKOVA V., **KLOUCKOVA J.**, DUROVCOVA V., LACINOVA Z., KAVALKOVA P., TRACHTA P., KOSAK M., MRAZ M., HALUZIKOVA D., HANA V., MAREK J., KRSEK M., HALUZIK M. The possible role of mRNA expression changes of GH/IGF-1/insulin axis components in subcutaneous adipose tissue in metabolic disturbances of patients with acromegaly. *Physiol Res*, 2016, 65(3), 493-503. IF: 1,643
- CINKAJZLOVA A., LACINOVA Z., **KLOUCKOVA J.**, KAVALKOVA P., TRACHTA P., KOSAK M., HALUZIKOVA D., PAPEZOVA H., MRAZ M., HALUZIK M. Angiopoietin-like protein 6 in patients with obesity, type 2 diabetes mellitus, and anorexia nervosa: The influence of very low-calorie diet, bariatric surgery, and partial realimentation. *Endocr Res*, 2017, 42(1), 22-30. IF: 1,476

- CINKAJZLOVA A., LACINOVA Z., **KLOUCKOVA J.**, KAVALKOVA P., TRACHTA P., KOSAK M., KRATKY J., KASALICKY M., DOLEZALOVA K., MRAZ M., HALUZIK M. An alternatively activated macrophage marker CD163 in severely obese patients: the influence of very low-calorie diet and bariatric surgery. *Physiol Res*, 2017. IF: 1,643

12.2. Prohlášení o samostatném zpracování dizertační práce

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 31.5.2017

Mgr. Jana Kloučková

12.3. Identifikační záznam

KLOUČKOVÁ, Jana. *Molekulární mechanizmy vzniku metabolického syndromu se zaměřením na nové hormony produkováné tukovou, jaterní a svalovou tkání. [Molecular mechanisms of metabolic syndrome with focus on new hormones produced by adipose tissue, liver and skeletal muscle]*. Praha, 2017. 136 stran. 5 příloh. Dizertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, ÚLBLD. Haluzík, Martin.

12.4. Plné verze publikovaných článků, které jsou podkladem dizertační práce

- **DRAPALOVA J., KOPECKY P., BARTLOVA M., LACINOVA Z., NOVAK D., MARUNA P., LIPS M., MRAZ M., LINDNER J., HALUZIK M.** The influence of deep hypothermia on inflammatory status, tissue hypoxia and endocrine function of adipose tissue during cardiac surgery. *Cryobiology*, 2014, 68(2), 269-275. IF: 1,920
- **KLOUCKOVA J., LACINOVA Z., KAVALKOVA P., TRACHTA P., KASALICKY M., HALUZIKOVA D., MRAZ M., HALUZIK M.** Plasma concentrations and subcutaneous adipose tissue mRNA expression of clusterin in obesity and type 2 diabetes mellitus: the effect of short-term hyperinsulinemia, very-low-calorie diet and bariatric surgery. *Physiol Res*, 2016, 65(3), 481-492. IF: 1,643